

外分泌液中の 食品タンパク質・IgA 免疫複合体

京都女子大学大学院 家政学研究科 生活環境学専攻

博士後期課程 食物栄養学領域

松永 安由

2015

目 次

はじめに	．．． 1
第 1 章 アレルギー感作母マウスによる母乳を介した経口免疫寛容の誘導	．．． 8
第 2 章 唾液中の食品タンパク質 IgA 免疫複合体	．．． 25
第 3 章 不完全 IgA 欠損症の発見	．．． 39
第 4 章 ヒト IgA に対するイムノクロマトグラフィーの開発	．．． 54
論文要旨	．．． 68
公 表	．．． 70
謝 辞	

はじめに

現在では3人に1人、すなわち一家に1人は何らかのアレルギー疾患を持つと言われている。なかでも乳幼児の食物アレルギーは、生命の維持・成長に不可欠な食品を原因とすること、アレルギーマーチと言われるように他のアレルギーや気管支喘息などへ移行することもあり、一層深刻な問題となっている。さらに、母親が摂取した食品タンパク質の一万～十万分の1程度が母乳中に検出されること、離乳食を始めていない乳児において既に卵白タンパク質に対するIgEが高い場合があることから、経母乳感作の可能性も示唆されている¹⁾。

我々が、卵アレルギー児が飲んでる母乳を鶏卵タンパク質のオボムコイド(OM)に対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAにて測定した際も^{2,3)}、37例中12例の母乳中にOMが検出された。しかし、その母乳をゲル濾過解析に供したところ、OMは本来の分子量である28kDa付近ではなく450kDa付近に溶出された。母乳中には食品タンパク質特異的分泌型IgA(sIgA)が存在するとの報告があったため、OMとsIgAの複合体の定量系を作って定量してみたところ、ちょうど450kDaのピークと一致した。1分子のsIgAは約390kDaであるため、2分子のOMが結合するとほぼ等しい分子量になる。またこの定量系に使用した抗体の特性から、OMがある程度高次構造を維持したまま、また糖鎖をつけたままの状態ですIgAとの免疫複合体(IgA-IC)として母乳中に分泌されていることが判明した(図1)⁴⁾。

その後の解析において、母乳中のアレルゲンについて次の様な結果が得られている⁵⁾。

- ①母乳中には、卵白(オボアルブミン;OVA)、牛乳(カゼイン、 β -ラクトグロブリン)、小麦(グリアジン)、そば、落花生由来のタンパク質もIgA-ICとして存在している。
- ②ほぼすべての母乳中に、それぞれに特徴的な(おそらくは母親の食事履歴に対応した)比率で食品タンパク質がIgA-ICとして存在している。
- ③母乳中のIgA-ICの存在パターンは、それを飲んでる乳児の食物アレルギーの有無や種類、程度に関係しない。
- ④抗原の摂取頻度が高いほど、特異的IgAが増加する。
- ⑤時として抗原が遊離で存在する。

一般に IgA は腸管において微生物や食品抗原の進入を防ぐ機能を担っており、母乳中の IgA も消化・吸収機構の未熟な乳児に対して同じ機能(アレルゲンの排泄)を果たしているものと考えられている。しかし、ここで示した様に母乳中の食物抗原特異的 IgA はすでに抗原と複合体を形成しており、免疫複合体であること自体に何か特殊な生理的合目的性があるのではないだろうか考えた⁶⁾。消化管付属リンパ組織における抗原取り込みは M 細胞が担当しているが、Neutra らにより抗原と IgA 免疫複合体が効率よく M 細胞に取り込まれて腸管免疫系を活性化すること⁷⁾、M 細胞表面に IgA 受容体が発現されていること⁸⁾が報告された。そこで我々は、母乳中の食品タンパク質 IgA 免疫複合体は経口免疫寛容の誘導因子として、授乳による離乳の準備機能を果たしているのではないかという作業仮説を立て、動物実験での立証を試みた。Th2 応答の抑制をアレルギー症状やサイトカインレベルで解析するため、マウスの OVA 依存食物アレルギー性下痢誘発系⁹⁾を導入した。

食餌中のタンパク質が卵白由来のみの E 群、牛乳由来のみの M 群に分けて BALB/c マウスを飼育・出産させ、各群の母乳中に各々の食餌タンパク質と IgA との免疫複合体が存在することを確認した。その母乳のみで育った両群の 3 週齢の仔マウスに卵白タンパク質を Alum とともに免疫した場合、E 群では M 群に比べて OM,OVA に対する血清 IgE および IgG1 が有意に低かった。IgG1 は、IL-4 などの Th2 サイトカイン刺激により IgE と挙動をともしする抗体である¹⁰⁾。また、このマウスに OVA を経口投与すると、M 群では下痢症状がみられ(図 2-a, b)、脾臓細胞の培養上清への OVA 依存 IL-4 産生が亢進していた。さらに、この M 群マウスに尾静脈への OVA 投与を行ったところアナフィラキシーショック死が起こった。一方、E 群ではこれらのアレルギー症状が抑制されていた。また、母親の食餌を出産後から卵白食としても、その母親に母乳哺育された仔に寛容が誘導されたことから、妊娠中の影響ではなく、母乳哺育によって経口免疫寛容が成立し、アレルギー発症を予防できることを証明した¹¹⁾。また、マウスだけでなくラットの母乳哺育実験においても母親が摂取したタンパク質特異的に仔に免疫寛容が誘導されることを証明し¹²⁾、種が異なっても普遍的に起こる現象であることが明らかになった。

そこで次に、母乳を介した経口免疫寛容の誘導因子が IgA-IC であることを明らかにしたいと考えた。まず、マウス腸間膜リンパ節由来の IgA 産生ハイブリドーマを樹立し、大量のマウスモノクローナル IgA の入手を可能にした。この IgA の特異性は不明であるが、主要な食物抗原には結合しないことを確認した。得られた IgA に化学的に OVA を結合させ仮性 IgA-IC を作り、抗 OVA 抗体と抗マウス IgA (α) 抗体のサンドイッチ ELISA により、その形成を確認した。

この仮性 IgA-IC を成マウスに経口投与後、OVA 感作したところ、遊離 OVA を相当量投与した対照群に比べて血清 OVA 特異的 IgG1 が有意に低下していた。また、脾臓細胞による OVA 依存 IL-4 産生も抑制されていた。したがって、IgA-IC が経口免疫寛容の直接の誘導因子となり得ることが証明できた¹¹⁾。さらにこの手法を使えば、寛容誘導を少量のアレルゲンで安全に行えたり、花粉アレルギーに対する舌下減感作療法 (SLIT) にも応用できる可能性があり、新たな Drug Delivery System として期待できる¹³⁾。

ただし、母乳による寛容も仮性免疫複合体による寛容も、耐性を獲得した抗原をその後摂取しなければ解除されてしまう可逆的なものであることが判明している¹²⁾。経口免疫寛容のメカニズムには、高濃度の抗原摂取により誘導されるクローナルデリーション、アナジー、低濃度の抗原摂取により誘導されるアクティブサプレッションの 3 つがある¹⁴⁾。母乳中の免疫複合体が低濃度であることから、母乳による Th2 応答の抑制はアクティブサプレッションのような弱い可逆的なものであると考えられる。したがって、母乳による抑制が持続している間に、離乳食を導入して乳児が自分自身の確固たる寛容を獲得していく必要がある。我々は母乳と同様に唾液中にも IgA-IC が存在することを明らかにしている¹⁵⁾。唾液中 IgA-IC は、自分が摂取した食品タンパク質の一部を利用して自分自身の経口免疫寛容を維持する働きをしているとも考えられ、その生理機能は興味深い。

また現在、食物アレルギー診療の手引きにおいても、「正しい診断に基づいた必要最小限の原因食物の除去」が治療・管理の原則とされ¹⁶⁾、妊娠中・授乳中にアレルギー疾患発症予防のために食物制限を行うことは、両親・同胞に 1 人以上のアレルギーを持つハイリスク児に対してさえも、欧米同様我が国においても推奨されていない^{17,18)}。しかし、アレルゲン感作を

恐れて、自らの判断で離乳を遅らせたり、除去を試みる母親が少なくないといわれており、離乳のタイミングと進行に関する正しい知識の普及が必要である。このことは、食物アレルギー治療としての寛容誘導(特異的経口寛容誘導:SOTI)においても、一旦獲得された寛容が解除される例が報告されていることと併せて、今後重要な課題となってくるように思われる。

そこで私は、母乳や唾液などの外分泌液に含まれる IgA-IC が「アレルギー予防の飲むワクチン」として機能することをさらに明確にすることで、母乳哺育の新たな機能を提唱し、妊娠中・授乳中の母親が偏りのない食生活を送ることの意義の普及に貢献するとともに、新しい食物アレルギー予防および治療法を確立したいと考えた。さらに、母乳だけでなく唾液中の IgA-IC の生理機能解明を目指した。

まず第 1 章では、前述のマウスにおけるアレルギー性下痢誘発モデルを用い、母親がアレルギー感作を受けた場合でも母乳哺育によって仔のアレルギー症状を抑制できるか否かを検証した。次に第 2 章では、ヒト唾液中食品タンパク質特異的 IgA および IgA-IC を解析し、母乳だけでなく外分泌液中のこれらの存在の普遍性を確認した。さらにヒト唾液から得た IgA-IC をマウスに直接投与し、経口免疫寛容を誘導するか否かを検証するとともに、pIC を用いたアレルギー予防・治療法の確立を目指した。さらに第 3 章では、唾液中 IgA-IC の個別解析を行った中で唾液中 IgA が極端に少ない被験者を見出し、その被験者が不完全 IgA 欠損症であることが判明した。この被験者およびその家族についてさらに詳細な解析を行ったので、その結果を報告する。そして第 4 章においては、唾液中 IgA を用いた IgA 欠損症の簡易スクリーニング法の作製に取り組んだ。

引用文献

- 1) 伊藤節子, 母乳への食物アレルギーの移行, アレルギー科, **14**, 298-303 (2002)
- 2) Hirose J., Kitabatake N., Kimura A. and Narita H., Recognition of native and/or thermally induced denatured forms of the major food allergen, ovomucoid, by human IgE and mouse monoclonal IgG antibodies. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 371-378 (2004)
- 3) Hirose J., Murakami-Yamaguchi Y., Ikeda M., Kitabatake N. and Narita H., Oligoclonal enzyme-linked immunosorbent assay capable of determining the major food allergen, ovomucoid, irrespective of the degree of heat denaturation, *Cytotechnology*, **47**, 145-149 (2005)
- 4) Hirose J., Ito S., Hirata N., Kido S., Kitabatake N. and Narita H., Occurrence of the major food allergen, ovomucoid, in human breast milk as an immune complex. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 438-440 (2001)
- 5) 成田宏史, 母乳哺育と食物アレルギー, 「食物アレルギーの治療と管理」改訂第2版, 小林・金子監修, 診断と治療社, 218—223 (2008)
- 6) 廣瀬潤子, 木津久美子, 成田宏史, 経口摂取したタンパク質の腸管通過機構とその生物学的合目的性—母乳中の食品タンパク質・IgA 免疫複合体の意義—, 化学と生物 **45**, 230-232 (2007)
- 7) Zhou F., Kraehenbuhl JP. and Neutra MR. Mucosal IgA response to rectally administered antigen formulated in IgA-coated liposomes. *Vaccine*, **13**, 637-644 (1995)
- 8) Mantis NJ., Cheung MC., Chintalacharuvu KR., Rey J., Corthesy B. and Neutra MR., Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J. Immunol.*, **169**, 1844-1851 (2002)
- 9) Brandt EB., Strait RT., Hershko D., Wang Q., Muntel EE., Scribner TA., Zimmermann N., Finkelman FD. and Rothenberg ME., Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J. Clin. Invest.*, **112**, 1666-1677 (2003)

- 10) Siebenkotten G, Esser C, Wabl M, Radbruch A (1992) The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur J Immunol* **22**: 1827-34.
- 11) Kumiko Kizu, Ayu Matsunaga, Junko Hirose, Akihiro Kimura, Hiroshi Narita Induction of Oral Tolerance in Neonatal Mice by Transfer of Food Allergens as IgA-Immune Complexes in Breast Milk. *Food and Nutrition Sciences* **6**: 221-33. (2015)
- 12) 木津 久美子, 廣瀬 潤子, 本庄 勉, 成田 宏史, 母乳哺育により母ラットの摂取タンパク質特異的に仔ラットの Th2 応答が抑制される, 日本栄養食糧学会誌, **65**, 13-19 (2012)
- 13) グリコ乳業株式会社, アレルギー予防剤及びそれを含む食品, 特許願 2010-044468
- 14) Chehade M. and Mayer L., Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **115**, 3-12 (2005)
- 15) 木津久美子, 廣瀬潤子, 山口 (村上) 友貴絵, 木村彰宏, 成田宏史, ヒト外分泌液中の食品タンパク質特異的 IgA およびその免疫複合体, 京都女子大学食物学会誌, **65**, 5-12 (2010)
- 16) 宇理須厚雄, 近藤直実監修, 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会作成 (2011) 食物アレルギー診療ガイドライン 2012, 協和企画, 東京.
- 17) Greer FR, Sicherer SH, Burks AW; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Allergy and Immunology (2008) Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children : the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics* **121**: 183-91
- 18) 厚生労働科学研究班 (研究代表者 : 海老澤元宏) (2015) 食物アレルギーの診療の手引き 2014, p 9-11. <http://www.foodallergy.jp/manual2014.pdf>

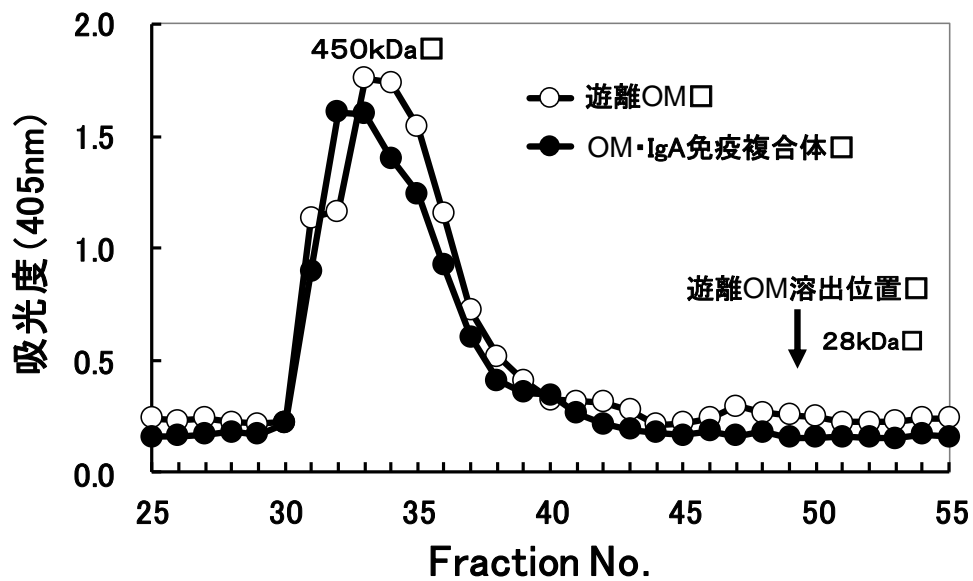


図 1. 母乳のゲル濾過解析⁴⁾

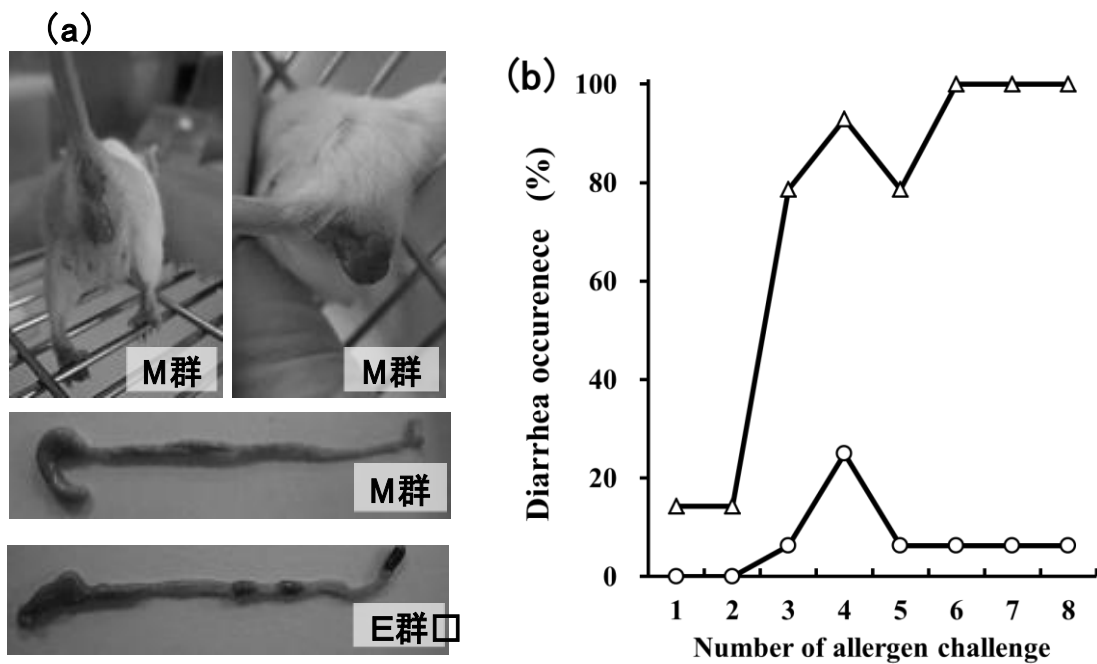


図 2 オボアルブミン特異的マウスアレルギー性下痢誘発実験

(a) 上：M 群における水様便，軟便，中央，下：大腸内の便。E 群ではしっかりした形状の便が形成されている。(b) E 群と M 群に OVA を経口投与し，下痢症状が誘発されるか否かを投与後 15～60 分間個別観察して評価した。各群のマウスのうち水様便を呈したマウスの割合を下痢誘発率として示した。この試験は 1～2 日おきに計 8 回行った。△は M 群，○は E 群。

第1章 アレルギー感作母マウスによる母乳を介した 経口免疫寛容の誘導

要 約

雌マウスをカゼイン餌で飼育し、オボアルブミン(OVA)と水酸化アルミニウムゲル(Alum)で腹腔免疫してアレルギー感作させた後交配し、授乳期間中のみ卵白餌を与えた母親を Allergy Egg (AE) 母とした。OVA で感作せずに交配し、授乳期間中のみ卵白餌を与えた母親を Egg (E) 母、授乳中もカゼイン餌を与え続けた母親を Milk (M) 母とした。各々の母親に母乳哺育された仔を離乳後 OVA と Alum で腹腔免疫し、OVA の経口投与によるアレルギー性下痢誘発試験を行ったところ、AE・E 仔では M 仔に比べて下痢が抑制された。更に、血清中 OVA 特異的 IgE、脾臓細胞培養液中 IL-4 も有意に低かった。また、AE 母乳中に IgA および IgG1 と OVA との免疫複合体が有意に増加していた。以上の結果より、母親がアレルギー感作を受けていても、母親が摂取したタンパク質特異的に母乳を介した経口免疫寛容が仔に誘導される事、その過程に母乳中の OVA 免疫複合体が関与している可能性が判明した。

はじめに

母乳は、ヒトが摂取するために作られる唯一の本来的な食品であり、乳児の未熟な身体機能に適した、栄養学的にも精神的にも優れた食品である¹⁾。さらに、母乳中のIgAは乳児が自身で抗体を産生できない間、乳児を感染症から守るという受動免疫因子として重要な役割を果たしている²⁻⁴⁾。一方、離乳食開始前にアトピー性皮膚炎と診断された生後2～6ヶ月の乳児の血清中に種々の食物抗原特異的IgEが検出されることから、母親が摂取した食品タンパク質が経母乳的にアレルギー感作を誘発していることが考えられ、母乳哺育の妨げとなっている⁵⁾。

しかしながら近年、アレルギー素因を持った母親の妊娠中・授乳中の除去食は子供のアトピー性皮膚炎の予防に効果がないどころか母親および児の栄養に悪影響を及ぼす可能性がある⁶⁾、かなり厳密なタマゴ除去をしても臍帯血や母乳へのオボアルブミン(OVA)の移行を阻止できなかったことから、妊娠中および授乳中の母親の除去食は“fruitless exercise”である⁷⁾などの報告が出されている。このような経緯から現在では、食物アレルギーの治療・管理は「正しい診断に基づいた必要最小限の原因食物の除去」が原則とされ⁸⁾、妊娠中・授乳中にアレルギー疾患発症予防のために食物制限を行うことは、両親・同胞に1人以上のアレルギーを持つハイリスク児に対してさえも、欧米同様我が国においても推奨されていない^{9, 10)}。しかし今のところ「除去の有効性に十分な根拠がない」というのがその理由であり、我が子の食物アレルギー発症を不安に思う母親の独断による予防的な食物除去をなくすためには、「リスクがある場合でも食べた方が良い」という積極的な科学的根拠を明確にしていくことが必要であると思われる。

我々は先行研究において、ヒト母乳中に卵白タンパク質が特異的IgAとの免疫複合体(IgA-Immune Complex: IgA-IC)の形で存在すること¹¹⁾、卵白タンパク質を摂取している母親の母乳で育った仔ラットおよび仔マウスでは、卵白タンパク質特異的に経口免疫寛容が誘導され、卵白タンパク質に対するアレルギーが抑制されることを明らかにし^{12, 13)}、母乳哺育の食物アレルギー予防効果を立証している。本研究では、あらかじめ卵白タンパク質でアレルギー感作を受けた母マウスの場合でも、母乳哺育を介した仔のアレルギー抑制が可能かどうかを検討することを目的として行った。正常マウスの場合と同様の抑制がかかれば、母親がアレルギー素因を持っているハイリスク児においても、母親は食物制限を行う必要がない、むしろ食べた方が良いことを示すことができる。

実験材料および方法

1. 実験動物および飼料

雌BALB/cマウス(日本エスエルシー(株))を室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度約50%、明暗サイクル12時間(6:00-18:00明期)の条件下でプラスチックケージに入れて飼育した。実験に用いた卵白食は、タンパク質として卵白タンパク質(キューピー(株)、乾燥卵白Kタイプ(CS)No.2に0.00025%ビオチンを補足)を用い、AIN-93Gに準じて調製し、水で練って成形した。

卵白食摂取期間以外は、タンパク質源がカゼインの市販飼育実験用餌(MF(飼育用)、オリエンタル酵母工業(株))を与え、水および餌は自由摂取させた。

なお、動物実験は「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年文部科学省告示第71号)」に基づき、京都女子大学動物実験規定にしたがって行った(許可番号:26-2)。

2. 実験方法

2.1) アレルギー感作母マウスによる母乳哺育(図1上段) 8週齢の雌マウスにOVA(シグマアルドリッチジャパン, Grade V) 50 μg を水酸化アルミニウムゲル(Alum, サーモフィッシャーサイエンティフィック) 2mgと混合して腹腔免疫し、その14日後に同量のOVAとAlumを追加免疫して感作した。感作および未感作のマウスを、初回免疫の7日後にあたる9週齢で交配した。感作し、授乳期間中のみ卵白食を摂取させた母マウスをAllergy Egg (AE) 母とした。対照として、感作せず授乳期間中のみ卵白食を摂取させた母マウスをEgg (E) 母、感作せず実験を通してMFを摂取させた母マウスをMilk (M) 母とした。いずれの群においてもそれぞれの母マウスの母乳で仔を育て、出産後21日目に母親の搾乳および採血を行った。なお、出産後10日目以降はケージから餌を除去し、母マウスだけを日中9時間別のケージに移して餌を摂取させ、仔マウスが母マウスの餌および糞を食べないようにした。

2-2) 仔マウスにおけるOVA特異的下痢誘発試験(図1下段) 各群の母親の母乳で育った仔マウスに、生後21日目の離乳と同時にOVA 10 μg をAlum 1mgとともに腹腔免疫し、さらに

その14日後に追加免疫をした。追加免疫の14日後から、OVA 20mg/200 μ L PBS (Phosphate buffered saline, 10mM NaPi, 140mM NaCl, pH7.4) の胃内強制投与による下痢誘発試験を開始した^{13, 14)}。マウスは、投与実施3～4時間前から絶食させた。投与後1時間下痢症状を呈するかどうかを個別に観察し、水様便が見られたマウスを下痢誘発ありと判断した。この下痢誘発試験は1日もしくは2日おきに計7回行った。5回目と6回目の試験の間に、全群に牛血清アルブミン (BSA, シグマアルドリッチジャパン) 20mgを投与し、下痢症状がOVA投与により特異的に起こることを確認した。下痢誘発試験終了後に採血ならびに脾臓摘出を行った。

2-3) マウス血清および母乳 マウスから採取した血液は37℃, 1時間で凝固させ、3,000 \times g, 5分, 4℃で遠心分離後上清を回収し血清試料とした。

母乳は出産21日後の母マウスから採取した。搾乳前16時間母子を別居させ、搾乳10分前に母マウスにオキシトシン (シグマアルドリッチジャパン) 1単位を皮下注射した。搾乳は実験動物搾乳装置WAT-2001 ((有)リトルレオナルド) を用いて行い、各母マウスから100-500 μ Lの母乳を採取した。得られた母乳を0.1%BSA/T-TBS (0.1%BSA, 0.05% Tween20添加Tris buffered saline) で2倍希釈後、10,000 \times g, 10分, 4℃で遠心分離し、浮遊する脂質層と沈殿層の中間層にあたる溶液部分を回収して母乳試料とした。いずれの試料も使用時まで-20℃で保存し、凍結融解を繰り返すことは避けた。

2-4) 特異的IgE, IgG1および免疫複合体の定量 血清中のOVA特異的IgEおよびIgG1は固相ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) により測定した¹³⁾。OVA特異的IgEの定量は、得られた血清試料をIg-Accept Protein G (ナカライテスク(株)) に供してIgGを除去した後に行った。なお、標準物質には市販のマウスIgG1 (サザンバイオテック) およびIgE (サザンバイオテック) を用いたため、結果はIgG1およびIgE相当量として示した。

母乳試料中のOVAの免疫複合体は、抗OVA抗体と抗IgA抗体もしくは抗IgG1抗体で構成されたサンドイッチELISAで定量し^{13, 15)}、それぞれの測定値はIgA (標準物質: インターセルテクノロジー) もしくはIgG1相当量として示した。

2-5) IL-4, OVAの定量 仔マウスから採取した脾臓細胞を、10%の牛胎児血清を含む RPMI1640培地にOVA添加および無添加条件で培養した。培養上清中のIL-4を市販の ELISAキット(サーモフィッシャーサイエンティフィック)を用いて定量し、結果はOVA添加条件のIL-4値からOVA無添加条件のIL-4値を差し引いて示した。

母乳試料中の遊離OVAは抗OVA抗体((株)森永生科学研究所)同士のサンドイッチELISAにて定量した。

3. 統計処理

統計処理はボンフェローニ・ダン検定によって行い、 $p < 0.05$ で有意差ありと判断した。ソフトは、4 Stepsエクセル統計第2版(オーエムエス出版, 2006)付属エクセルアドインソフトStatcel 2を用いた。

結果

本研究では、母マウスをアレルギー感作させたハイリスク児において、母親が摂取したタンパク質特異的に母乳哺育を介して経口免疫寛容が誘導されるか否かを検討した。実験の全体の流れを図1にまとめた。

1. 母親のOVAアレルギー感作の確認

まず、8週齢の雌マウスにIgE産生を惹起するAlumを助剤としてOVAを腹腔免疫し、その7日後に交配、14日後に追加免疫を行った。出産まではMF、出産後(授乳中)は卵白食を与え、これをAE母とした。出産の3週間後(離乳時)に採取した血清中のOVA特異的IgE, IgG1を定量したところ、感作せず授乳期間中のみ卵白食を摂取させたE母と、感作せず実験を通してMFを摂取させたM母に比べて、AE母においてOVA特異的IgE, IgG1がともに有意に高かった(図2)。したがって、AE母においてOVAアレルギー感作が成立したことが確認できた。AE母の中には授乳中軽い軟便傾向を示すものもいたが、症状の悪化は見られなかった。

2. 食物アレルギー性下痢誘発試験

アレルギー感作を受けた母親による母乳哺育が仔の食物アレルギー発症に及ぼす影響を評価するために、強力なTh2細胞応答に付随する液性および細胞性免疫応答や敏感なアレルギー性下痢症状を伴う、経口抗原誘導性の腸管炎症マウスモデル系を導入した¹⁴⁾。離乳後OVAとAlumで免疫した各群の仔マウスに、OVAを胃内強制投与して下痢症状が誘発されるかどうかを評価した(図3)。我々は既に本食物アレルギーモデル系を用いた先行研究において、母親が交配時から牛乳タンパク質のみをタンパク源とした餌を摂取していた群では仔の下痢症状が誘発され、逆に卵白食を摂取していた群では抑制されることを報告している¹³⁾。本研究では仔における経口免疫寛容の誘導が母親の授乳中の食事に依存していることを明確に示すために、E母、AE母ともに卵白食摂取は授乳中に限定した。その結果、今回の実験条件においても、母乳哺育を介してOVAに対する経口免疫寛容を獲得しているE仔では下痢誘発率は低い水準で推移したが、M仔ではOVAの投与回数が増えるにしたがって症状の悪化(軟便から水様便)、下痢誘発率の上昇がみられた。つまり、寛容誘導は授乳時に成立していることになる。さらに、この下痢誘発率の抑制はAE仔においても観察され、7回目の下痢誘発試験時には、M仔で下痢誘発率が70%に達しているのに対し、E仔では12%、AE仔においても26%であった。したがって、母親がアレルギー感作を受けていても、乳児において授乳中に母親が摂取したタンパク質に対する経口免疫寛容が誘導されることが示された。また、全7回のOVA投与に加え、途中でBSAを1回投与したところ、すべての群において下痢が起らなかったことから、ここで観察される下痢はOVA特異的なアレルギー症状であることが確認された。

このモデルにおける下痢症状は、腸管および全身性の免疫応答つまり抗原特異的な抗体やサイトカインの産生の結果として生じることが明らかにされている¹⁴⁾。そこで、下痢誘発試験終了後に血清中のOVA特異的IgEを解析したところ、M仔に比べてE仔のみならずAE仔においても産生が有意に抑制されていた(図4(a), $p < 0.01$)。また、各群のマウスから脾臓を摘出し、OVA刺激下で脾臓細胞を培養して分泌されるサイトカインを解析したところ、IgE産生を活

性化するサイトカインであるIL-4の産生がE仔, AE仔においてM仔に比べて有意に抑制されていた(図4(b), $p < 0.01$)。一方, IgE産生を抑制するサイトカインであるTGF- β の産生量には群による有意な差は見られなかった(データ非表示)。したがって, 本実験で観察されたアレルギー性下痢の抑制は, IL-4産生の抑制によるIgE産生の抑制を経て起っている現象であることが判明した。

3. 母乳中の免疫複合体

このマウス食物アレルギーモデル実験系は経口抗原誘導性である。我々は本モデルを用いた先行研究において, 母乳中のIgA免疫複合体(IgA-IC)が寛容誘導因子として機能していることを報告した¹³⁾。そこで各群の母親から出産21日後に採取した母乳中のOVAのIgA-ICおよび遊離OVAを定量したところ, OVAのIgA-ICはE, M母乳と比べてAE母乳のみで有意に高く(図5(a), $p < 0.01$), 遊離OVAはE母乳においてのみ有意に高く含まれていた(図5(b), $p < 0.01$)。

先行研究ではM母乳と比較してE母乳ではIgA-ICの濃度が有意に高かったが, 本研究では有意差は見られなかった。OVAのIgA-IC定量は固相化抗体に抗OVA抗体を用いたサンドイッチELISAによって行っており, 遊離のOVAが存在するE母乳ではIgA-ICの定量が阻害され, 定量値が低く出ているものと思われる。また, 先行研究のE母には交配時から卵白食を摂取させていたのに対し, 本研究では授乳期間のみとOVA摂取が3週間短いため, IgAの誘導が不十分であったことが影響しているものと考えている。

一方Mosconi *et al.*は, アレルギー感作後経鼻的に抗原暴露を受けた母親の母乳中に含まれる食品タンパク質とIgGとの免疫複合体(IgG-IC)が, 仔マウスに経口免疫寛容を誘導し乳児のアレルギー性喘息を予防すると報告している¹⁵⁾。そこで本食物アレルギーモデルのAE母乳中のOVAに対するIgG1-ICを測定したところ, M, E母乳と比較してAE母乳において有意に高い値を示した(図6, $p < 0.05$)。前述したように, 母親の血清中OVA特異的IgG1がAE母で有意に亢進していたことから(図2(b), $p < 0.01$), AE母乳中のOVAに対するIgG1-ICの増

加は、母親のアレルギー誘導により、IgEに付随して血清中に増加したIgG1が母乳へ移行した可能性が考えられた。

考察

消化を逃れたタンパク質が粘膜上皮細胞に取り込まれ、その下流に組織化されている腸管免疫系を活性化すると、そのタンパク質特異的な分泌型IgAが合成され抗原の排除抗体として機能したり、経口免疫寛容によってIgE、IgG1産生が抑制される。この系の未熟もしくは破綻が食物アレルギー発症の原因の一つと考えられている^{16, 17)}。我々はこれまでに、正常な母マウスによる母乳哺育を介して仔マウスに食餌タンパク質に対する経口免疫寛容が誘導され、当該タンパク質に対する食物アレルギーの発症が抑制されることを明らかにしてきた¹³⁾。また、この寛容誘導は、食品、タンパク質、動物の種類に拘らず普遍的に起こっている自然な現象であった¹²⁾。さらに本論文において、母マウスがアレルギー感作を受けている場合でも母乳哺育により寛容が誘導されることが立証されたことにより、母乳哺育の食物アレルギー予防効果が再確認されるとともに、母親がアレルギー素因を持つハイリスク児においてさえ授乳婦の予防的食物制限は不要であることが明らかとなった。つまり、予防的制限が推奨されないのは「有効性に十分な根拠がない」からと言う消極的な意味においてではなく、「リスクがあっても食べることに積極的な意味がある」ためと考えて良いのではないだろうか。

このように、母乳哺育は母マウスのアレルギー素因の有無に関係なく仔の食物アレルギーの予防に効果があるが、そのメカニズム(寛容の誘導因子)は素因の有無によって少し異なるのかもしれない。我々は、これまでにヒト、マウス、ラットの母乳中に種々の食物アレルゲンがIgA-ICとして存在していることを明らかにし、正常な母ラット、マウスを使った母乳哺育あるいは仮性IgA-ICの直接投与による寛容誘導を証明してきた^{12, 13)}。IgA-ICがIgA特異的なレセプターを介して抗原のキャリアーとして働き、その結果IgA産生を亢進させ粘膜免疫系を成熟させること^{18, 19)}、分泌型IgAに抗原が結合すると小腸プロテアーゼに対する感受性が下がり、細胞のIgAレセプターへの結合性が高まること²⁰⁾が報告されており、正常な母親の母乳中の

IgA-ICが乳児の寛容誘導因子として生理的に機能していることを支持している²¹⁾。詳細なメカニズムの検討は今後の課題であるが、IgA-ICのレセプターを介した食物抗原の取り込み効率の向上が腸管免疫系の活性化を惹起し、IL-4やIgE産生の抑制を通じたアレルギー性下痢の抑制、つまり免疫寛容を誘導しているものと思われる。

これに対して、消化管内には胎児性IgGレセプター依存のシャトルが存在し、これを介してIgGが上皮細胞から管腔側に一度分泌され、そこで抗原と結合して形成されたIgG-ICが、再度細胞内に戻ることによって粘膜免疫系を活性化するというIgG経路が報告されている²²⁾。本論文においても、AE母乳ではIgA-ICとともにIgG1-ICも検知されており、アレルギー感作母による寛容誘導にはこの経路も関与しているかもしれない^{15, 23, 24)}。IgG1とIgE合成はともにIL-4によって支配されている²⁵⁾。したがって、母マウスへのアレルギー感作でIgEとともに血清中に誘導されたIgG1に抗原が結合して母乳に分泌され、これを飲んだ仔マウスの胎児性IgGレセプターで取り込まれて寛容誘導が起こるのではないだろうか。母親がアレルギーの場合、一層仔をアレルギーから守ろうとする機能が働くかもしれないことを考えると、IgA経路に対して補強的となるIgG1-ICによる寛容は生物学的には極めて理にかなった現象と思われる。実際にマウスでは母乳中IgGの存在はよく知られており、乳腺における胎児性IgGレセプターの発現、機能が報告されている^{22, 26)}。ヒト乳腺においても胎児性IgGレセプター発現の報告があるが、詳細は不明である²⁷⁾。また、我々の測定結果では、正常ヒト母乳中にOVA特異的IgGおよびその免疫複合体を定量できる場合もあるが、IgAと比較して非常に低いことが判明している（データ非表示）。今後、ヒトアレルギー母の母乳解析が必要と思われる。

最後に、正常動物においては食餌による経口免疫寛容によりIgE (IgG1) 産生は抑制されるはずであるため、母乳中にIgG1-ICが分泌され寛容誘導に寄与することは辻褄が合わない。つまり、IgG1-IC経路は母親がアレルギーである場合の特殊例であって、正常状態ではIgA-ICが誘導因子として機能しているものと考えられる。したがって、我々は母乳哺育による本来的な寛容が、特別な処置なしに自然な食生活（食習慣）に支えられた哺乳によって乳児に獲得されると考え、「母乳は離乳食のはじまり：食物アレルギー予防の天然の飲むワクチン

である」という仮説を提唱している^{13, 28, 29)}。今後は、食事歴、摂取量、個々の母親の健康状態や体質に応じて、ヒトおよび動物の母乳中のIgA-ICがどのように変動するか、また、母乳中のIgA-ICとそれを飲んだ乳児の臨床症状との関連を解析する必要があるだろう。さらに近年、舌下減感作療法(sublingual immunotherapy (SLIT))や特異的経口耐性誘導(specific oral tolerance induction (SOTI))が臨床的に導入されてきている³⁰⁾。IgAにせよIgGにせよ、免疫複合体の生物学的重要性が確立できれば、新しいアレルギー治療、ドラッグデリバリーシステムへの応用が期待できると思われる。

本研究はJSPS 24658128の助成を受けたものである。

引用文献

- 1) Johnston M, Landers S, Noble L, Szucs K, Viehmann L (2012) Policy statement :
Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics* **129**: e827–e841.
- 2) Labbok MH, Clark D, Goldman AS (2004) Breastfeeding : maintaining an irreplaceable
immunological resource. *Nat Rev Immunol* **4**: 565-72.
- 3) Ip S, Chung M, Raman G, Chew P, Magula N, DeVine D, Trikalinos T, Lau J (2007)
Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid Rep
Technol Assess* **153**: 1-186.
- 4) Brandtzaeg P (2003) Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed
infant. *Vaccine* **21**: 3382-8.
- 5) 伊藤節子 (2002) 母乳への食物アレルギーの移行. アレルギー科 **14**: 298-303.
- 6) Kramer MS, Kakuma R (2006) Maternal dietary antigen avoidance during pregnancy or
lactation, or both, for preventing or treating atopic disease in the child. *Cochrane Database
Syst Rev* **3**: CD000133.
- 7) Vance GH, Lewis SA, Grimshaw KE, Wood PJ, Briggs RA, Thornton CA, Warner JO
(2005) Exposure of the fetus and infant to hens' egg ovalbumin via the placenta and breast
milk in relation to maternal intake of dietary egg. *Clin Exp Allergy* **35**: 1318-26.
- 8) 宇理須厚雄, 近藤直実監修, 日本小児アレルギー学会食物アレルギー委員会作成
(2011) 食物アレルギー診療ガイドライン2012, 協和企画, 東京.
- 9) Greer FR, Sicherer SH, Burks AW; American Academy of Pediatrics Committee on
Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Allergy and Immunology (2008)
Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and
children : the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of
complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics* **121**: 183-91

- 10)厚生労働科学研究班(研究代表者:海老澤元宏)(2015)食物アレルギーの診療の手引き2014, p 9-11. <http://www.foodallergy.jp/manual2014.pdf>
- 11) Hirose J, Ito S, Hirata N, Kido S, Kitabatake N, Narita H (2001) Occurrence of the major food allergen, ovomucoid, in human breast milk as an immune complex. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 1438-40.
- 12) 木津 久美子, 廣瀬 潤子, 本庄 勉, 成田 宏史(2012)母乳哺育により母ラットの摂取タンパク質特異的に仔ラットのTh2応答が抑制される. 日本栄養・食糧学会誌, **65**: 13-19.
- 13) Kumiko Kizu, Ayu Matsunaga, Junko Hirose, Akihiro Kimura, Hiroshi Narita (2015) Induction of Oral Tolerance in Neonatal Mice by Transfer of Food Allergens as IgA-Immune Complexes in Breast Milk. *Food and Nutrition Sciences* **6**: 221-33.
- 14) Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, Zimmermann N, Finkelman FD, Rothenberg ME (2003) Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest* **112**: 1666-77
- 15) Mosconi E, Rekima A, Seitz-Polski B, Kanda A, Fleury S, Tissandie E, Monteiro R, Dombrowicz DD, Julia V, Glaichenhaus N, Verhasselt V (2010) Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. *Mucosal Immunol* **3**: 461-74.
- 16) Brandtzaeg P (2010) The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr* **156**: S8-15.
- 17) Berin MC, Mayer L (2013) Can we produce true tolerance in patients with food allergy? *J Allergy Clin Immunol* **131**: 14-22.
- 18) Weltzin R, Lucia-Jandris P, Michetti P, Fields BN, Kraehenbuhl JP, Neutra MR (1989) Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells : demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J Cell Biol* **108**: 1673-85.

- 19) Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacharuvu KR, Rey J, Corthésy B, Neutra MR (2002) Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells : evidence for a novel IgA receptor. *J Immunol* **169**: 1844-51.
- 20) Duc M, Johansen FE, Corthésy B (2010) Antigen binding to secretory immunoglobulin A results in decreased sensitivity to intestinal proteases and increased binding to cellular Fc receptors. *J Biol Chem* **285**: 953-60.
- 21) Mantis NJ, Rol N, Corthésy B (2011) Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* **4**:603-11.
- 22) Nakata K, Kobayashi K, Ishikawa Y, Yamamoto M, Funada Y, Kotani Y, Blumberg RS, Karasuyama H, Yoshida M, Nishimura Y (2010) The transfer of maternal antigen-specific IgG regulates the development of allergic airway inflammation early in life in an FcRn-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **395**: 238-43.
- 23) Verhasselt V (2010) Oral tolerance in neonates: from basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal Immunol* **3**: 326-33.
- 24) Yamamoto T, Tsubota Y, Kodama T, Kageyama-Yahara N, Kadowaki M (2012) Oral tolerance induced by transfer of food antigens via breast milk of allergic mothers prevents offspring from developing allergic symptoms in a mouse food allergy model. *Clin Dev Immunol* **2012**: 721085.
- 25) Siebenkotten G, Esser C, Wabl M, Radbruch A (1992) The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur J Immunol* **22**: 1827-34.
- 26) Cianga P, Medesan C, Richardson JA, Ghetie V, Ward ES (1999) Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice. *Eur J Immunol* **29**: 2515-23.

- 27) Cianga P, Cianga C, Cozma L, Ward ES, Carasevici E (2003) The MHC class I related Fc receptor, FcRn, is expressed in the epithelial cells of the human mammary gland. *Hum Immunol* **64**: 1152-9.
- 28) 成田宏史 (2008) 母乳哺育と食物アレルギー: 食物アレルギーの治療と管理, 改訂第2版 (小林陽之助, 金子一成監修), p 218-24. 診断と治療社, 東京
- 29) 成田宏史 (2014) 母乳中の鶏卵アレルギーの存在形態と生物学的役割. 日本食品科学工学会誌 **61**: 450-54.
- 30) Burks AW, Laubach S, Jones SM (2008) Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy : implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* **121**: 1344-50.

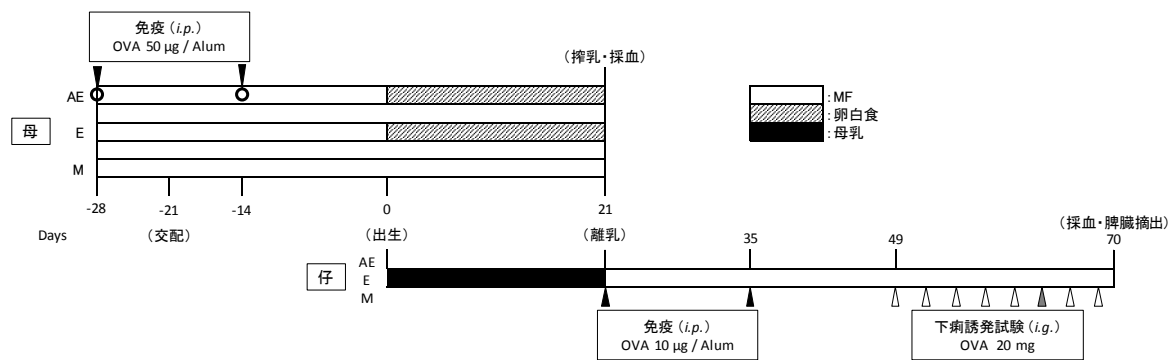


図1. 動物実験の概略

上段に母親，下段に仔の実験プロトコルをそれぞれ示した。試験群である Allergy Egg (AE) 母には，OVA を 2 回腹腔免疫 (*i.p.*) して感作し，授乳期間中のみ卵白食 (▨) を摂取させた。対照群の Egg (E) 母は，感作せずに授乳期間中のみ卵白食を摂取させ，Milk (M) 母は感作せずに実験を通して MF (□) を摂取させた。各群の母マウスの母乳 (■) で育った仔マウスに離乳後 OVA を 2 回腹腔免疫 (*i.p.*) して感作し，OVA の胃内投与 (*i.g.*) による下痢誘発試験を行った。(b) 解除系：腹腔免疫を離乳後 3 週間経ってから行った。

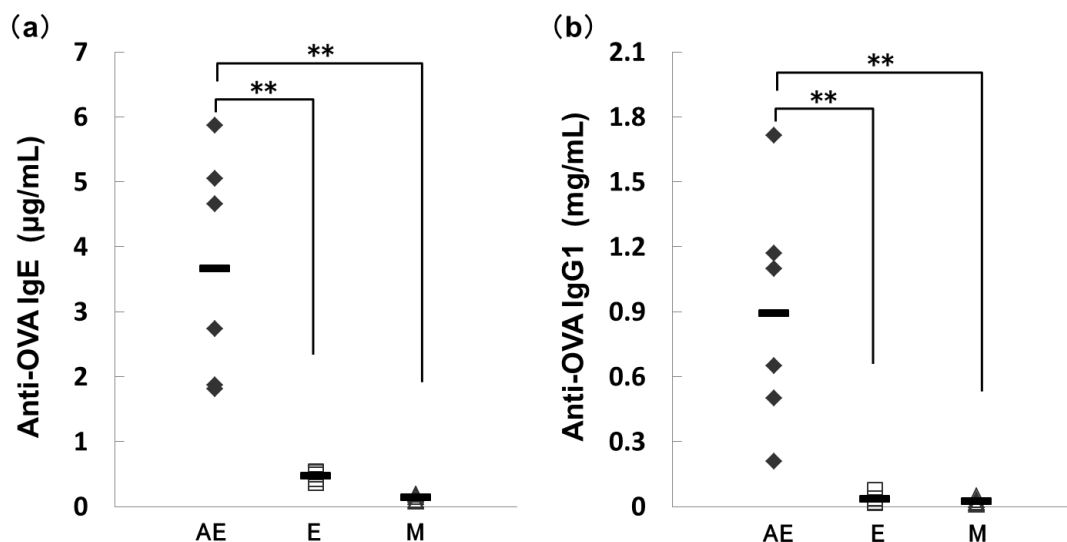


図 2. 母マウスの血清中 OVA 特異的 IgE と IgG1

出産 21 日後に AE 母 (◆, $n=6$) および E 母 (□, $n=5$), M 母 (△, $n=5$) より採血し，血清中 OVA 特異的 IgE (a) と IgG1 (b) を測定した。定量結果は IgE, IgG1 相当量で表した。統計解析はボンフェローニ・ダン検定で行った。横棒は平均値，** $p < 0.01$ 。

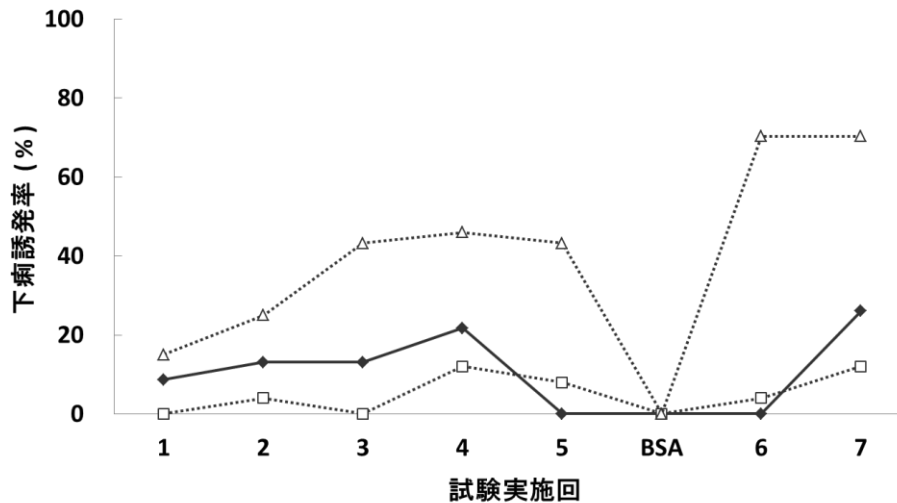


図 3. 仔マウス OVA 特異的下痢誘発率

仔マウスを離乳後 OVA で感作した後、計 7 回 OVA を胃内強制投与する下痢誘発試験を行い、下痢誘発率を求めた。5 回目と 6 回目の間には OVA の代わりに BSA を投与した。◆:AE 仔 ($n=23$), □:E 仔 ($n=26$), △:M 仔 ($n=37$)

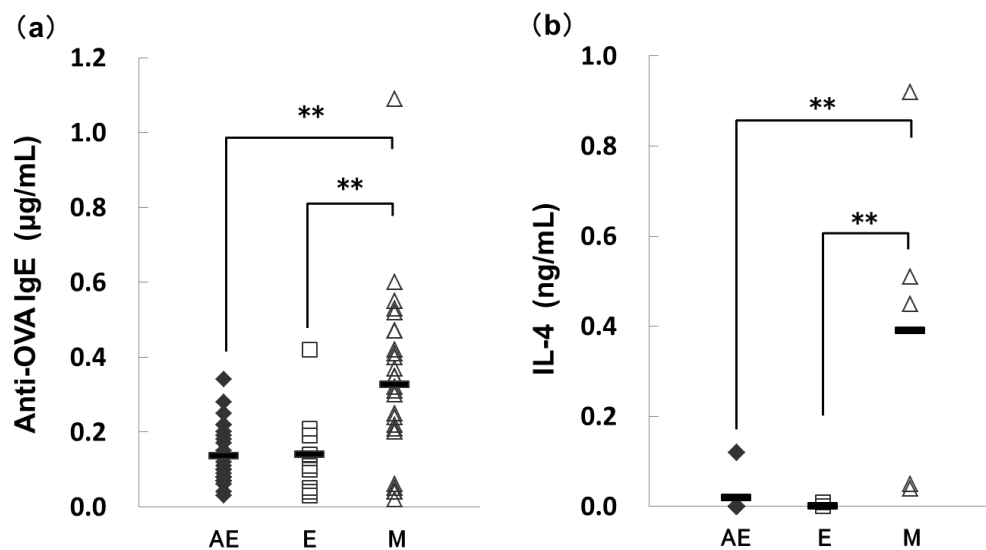


図 4. 仔マウスにおける Th2 応答

下痢誘発試験終了後、血清中 OVA 特異的 IgE をサンドイッチ ELISA で測定し、結果は IgE 相当量で表した(a)。AE 仔 (◆, $n=27$), E 仔 (□, $n=14$), M 仔 (△, $n=27$)。さらに、仔マウスから脾臓を摘出し、OVA 刺激下で産生された IL-4 を解析した(b)。AE 仔 ($n=9$), E 仔 ($n=7$), M 仔 ($n=5$)。両者とも統計解析はボンフェローニ・ダン検定で行った。横棒は平均値, ** $p < 0.01$ 。

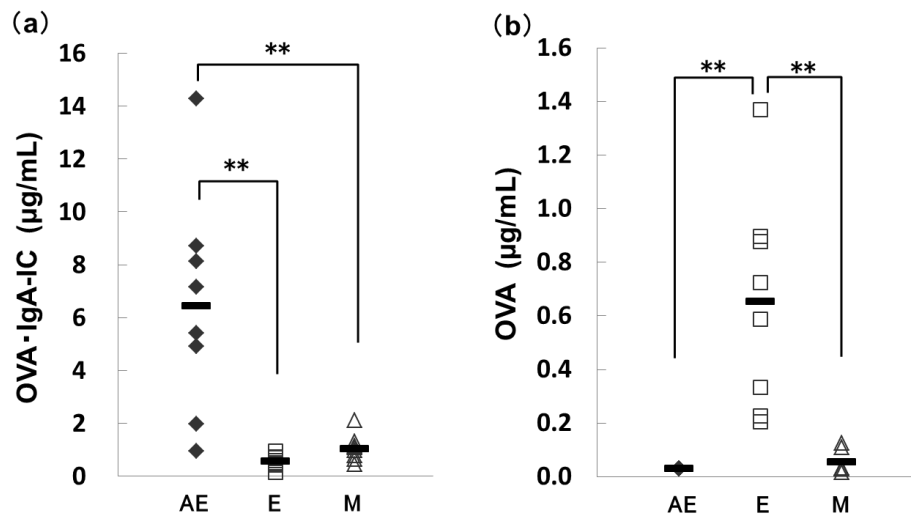


図 5. 母乳中の OVA・IgA 免疫複合体と遊離 OVA

出産 21 日後に母マウスから搾乳し、母乳中の OVA・IgA-IC を定量し、結果は IgA 相当量で表した (a)。AE 母乳 (◆, $n=8$), E 母乳 (□, $n=10$), M 母乳 (△, $n=11$)。さらに、サンドイッチ ELISA で母乳中の遊離 OVA の定量を行った (b)。AE 母乳 ($n=6$), E 母乳 ($n=8$), M 母乳 ($n=7$)。なお、母乳試料数を増やすため、図 2 と同じ条件で仔の下痢実験を実施しない母親を補足飼育し、その母乳を採取・評価した。そのため図 2 とは n 数が異なっている。いずれも統計解析はボンフェローニ・ダン検定で行った。横棒は平均値, $**p<0.01$ 。

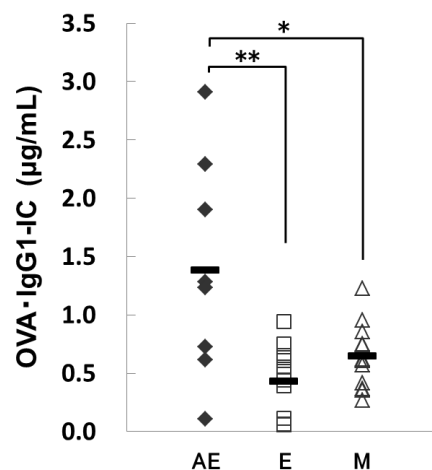


図 6. 母乳中の OVA・IgG1 免疫複合体

出産 21 日後に採取した母乳中の OVA・IgG1-IC を定量し、結果は IgG1 相当量で表した。AE 母乳 (◆, $n=8$), E 母乳 (□, $n=12$), M 母乳 (△, $n=12$)。統計解析はボンフェローニ・ダン検定で行った。横棒は平均値, $**p<0.01$, $*p<0.05$ 。

第2章 唾液中の食品タンパク質 IgA 免疫複合体

要 約

外分泌液における IgA-IC の存在の普遍性を確認することを目的として唾液解析を行った結果、唾液中の IgA-IC を構成している食品タンパク質は食事残渣のコンタミではなく、唾液中に分泌されているものであることが明らかになった。

さらに IgA-IC が経口免疫寛容の誘導因子であることを立証するために、唾液をゲルろ過して得られた OVA・IgA-IC 画分を直接マウスに投与後、OVA をアジュバントとともに免疫して血清中 OVA 特異的 IgG1 を評価したところ、対照群に比べて産生が抑制されていた。またその応用として、マウスモノクローナル IgA にスギ花粉抗原の Cry j1 を化学結合させた仮性 IgA-IC を作製してマウスに投与した結果、対照群と比べて仮性 IgA-IC 投与群で Cry j1 に対する IgG1 の産生と Cry j1 依存 IL-4 の産生が低下していた。以上の結果より、IgA-IC がアレルギー治療用のワクチンとして利用できる可能性が示された。

はじめに

抗体はウイルスや微生物毒素の不活性化や、侵入した病原体を殺す補体系や種々の白血球の動員によって、脊椎動物を感染から防御する一群のタンパク質である。典型的な抗体分子は同一の H 鎖 2 本と同一の L 鎖 2 本からなる 4 本のポリペプチド鎖で構成され、H, L 両鎖の一部の組み合わせにより抗原結合部位が形成される。抗体には 5 つのクラス (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) があり、それぞれ異なる H 鎖 (α , δ , ϵ , γ , μ) を持つ。H 鎖は抗体の尾部 (Fc 領域) も形成する。この Fc 領域によってその抗体が抗原以外のどんなタンパク質に結合するかが決定され、その結果、そのクラスの抗体が持つ生物学的性質 (機能) が決定される¹⁾。

これらすべての免疫グロブリンの一日の総生産量は、体重 70kg のヒトで 8g 程度で

ある。このうち IgA は約 5g を占め、その 3 分の 2 (約 3g) が分泌型 IgA (secretory IgA : sIgA) として粘膜表層に分泌され、体内に侵入する抗原や異物に対する最前線の感染防御に重要な役割を果たしている。IgA には血清型 IgA と sIgA があり、血清型 IgA は単量体で、sIgA は血清型 IgA 二分子に糖タンパク質の J 鎖と secretory component (SC) が結合している。循環系の免疫グロブリンの主役は IgG で、IgA は脇役に過ぎないが、粘膜局所においてはその位置関係は逆転し、sIgA が主要な役割を担う²⁾。

これまで sIgA のほとんどが微生物やハウスダストに対するものであると報告され、食物抗原に対するものは注目されていなかったが、我々は、ヒト母乳中に主要食物アレルギーである卵白オボムコイドが特異的 sIgA との免疫複合体 (IgA-IC) として存在していることを発見した³⁾。Corthésy らが、腸管 M 細胞に発現された IgA 受容体が IgA 免疫複合体を積極的に取り込んで抗原特異的 IgA 産生を誘導すると報告していることから^{4,5)}、我々は、「母乳中の IgA 免疫複合体を介した離乳あるいは経口免疫寛容」なる母乳の新たな生理機能を提唱し、母乳哺育の重要性に言及してきた^{6,7,8,9)}。

本研究では、唾液中の食物抗原特異的 IgA および IgA 免疫複合体を解析し、母乳のみならず外分泌液におけるこれらの存在の普遍性を確認した。さらに、IgA 免疫複合体を直接マウスに投与することによる経口免疫寛容の成立の如何を調べてこの仮説を立証すること、またその応用として IgA 免疫複合体をワクチンとして利用したアレルギー治療法の確立を検討することを目指した。

材料および方法

1. 唾液の採取および処理

唾液試料への食事残渣の混入を防ぐために、唾液採取は食後を避けて行うこととした。さらに、唾液採取前には研磨剤を付けずに約 3 分間、舌下も含めて出血しないように歯を磨いた後、水道水で十分うがいをした。うがい後は水道水によって唾液が薄まっているので、すぐに唾液採取を開始せずしばらく待ち、きれいに洗った手で脱脂

綿を折りたたんで舌下に入れた。3分後、唾液を吸収した脱脂綿をきれいな手で取り出し、15mL 遠心チューブに入れて直ちに凍結し、IgA 測定まで-20℃で保存した。測定時に試料を緩慢解凍し 15mL 遠心チューブの蓋に脱脂綿をかませた状態で、10,000g ×10 分、4℃で遠心することにより唾液を回収し、沈殿した夾雑物を除いた上清を唾液試料とした。個人の試料を混合したプール唾液を常法にしたがい 75% 硫酸分画し、透析後ゲル濾過した（HiPrep 26/60 Sepahacryl S-300 column, GE ヘルスケア）。

唾液の採取は、京都女子大学臨床研究倫理審査委員会の許可を得た上、協力者に研究の趣旨を説明し、十分な研究の理解と研究協力の同意を得て行った。

2. 試料中の IgA の測定

唾液中の総 IgA および食品タンパク質・IgA 免疫複合体をサンドイッチ ELISA（Enzyme Linked Immunosorbent Assay），食品タンパク質特異的 IgA を固相 ELISA により測定した。

2-1) 総 IgA の測定 抗ヒト IgA（ α ）（Zymed Laboratories 社製）を PBS（10mM NaPi, 0.15M NaCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4）で 5 μ g/ml に希釈し、その 50 μ L を 37℃, 1 時間で 96 穴プレートに固相化後、これを PBS で 3 回洗浄し、1%BSA/PBS によりブロッキングした（37℃1 時間,もしくは 4℃一晚）。PBS で 3 回洗浄後、一次反応として唾液もしくは涙試料を 37℃で 1 時間反応させ、続いて、トリス緩衝食塩溶液（Tris Buffer Saline : TBS, 10mM Tris-HCl Buffer,0.15M NaCl,pH7.4）で 1 回、0.05%Tween20 入り TBS（T - TBS）溶液で 5 回、TBS で 1 回洗浄後、0.1%BSA/T - TBS 溶液で 0.1 μ g/ml に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgA（ α ）（American Qualex Antibodies 社製）50 μ L/well を 37℃で 1 時間反応させた。TBS で 1 回、T - TBS 溶液で 5 回、TBS で 1 回洗浄した後、 p -ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として反応させ、405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー（Model 3550, Bio - Rad 社製）を用いて測定した。この時、標準品にはヒト sIgA（Cappel, MP Biomedicals 社製）を用

い、一次反応時に 0~200ng/mL の濃度で反応させ、得られた検量線を用いて試料中の濃度を求めた。

2-2) 食品タンパク質・IgA 免疫複合体の測定 卵白タンパク質であるオボアルブミン (OVA) , オボムコイド (OM) , および牛乳タンパク質であるカゼインについての IgA 免疫複合体を測定した。すなわち、抗 OVA ポリクローナル抗体、もしくは抗 OM ポリクローナル抗体、もしくは抗カゼインポリクローナル抗体が固相化、ブロッキングされている ELISA プレート(森永生科学研究所より供与)に試料を 50 μ L 供し、37°C で 1 時間反応させた。その後は、総 IgA の測定と同様に行った。また、各 IgA 免疫複合体の標準品は市販品として存在しないため、検量線も総 IgA と同じ条件で作製した。よって、本研究で示す IgA 免疫複合体量は sIgA 当量で示している。

2-3) 食品タンパク質特異的 IgA の測定 OVA (京都大学 北畠研究室より供与) , OM (第一化成) , もしくは α -カゼイン (SIGMA) をそれぞれ 5 μ g/ml, 50 μ L/well で固相化し、1%BSA/PBS によりブロッキングした。その後は、IgA 免疫複合体の測定と同様に行った。よって、本研究では特異的 IgA も sIgA 当量として示している。

3. 動物

5~13 週齢の市販のカゼインベースの食餌 (オリエンタル酵母社, ラット・マウス用 MF 飼料 : 以下, 通常食) 飼育した雌の BALB/c マウスを使用した。なお、動物実験は、「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年文部科学省告示第 71 号)」に基づき、京都女子大学動物実験規定に従って行った。

4. 仮性 IgA 免疫複合体の作製と投与⁹⁾

PBS-EDTA (0.1M NaPi , 0.15M NaCl , 1mM EDTA , 0.02% NaN₃ , pH 7.5) に Cry j 1 を 2.5mg/1mL で溶解させ、20mM Sulfosuccinimidyl 6-[3' (2-pyridyldithio)-propionamide]hexanoate : Sulfo-LC-SPDP (Thermo 社製) 溶液を 42 μ L

添加し、室温で 30 分反応させた。その後、透析により反応に使われなかった Sulfo-LC-SPDP を除去し、Cry j 1 : IgA がモル比 5 : 1 になるように IgA を添加して一晩室温にて反応させた。その後、Protein L カラムにより IgA と結合しなかったピリジルジチオール-Cry j 1 を素通り画分に除去し、吸着したものを 0.1M グリシン-HCl pH2.98 で溶出して 0.1M Tris-HCl pH9.6 で中和し、Cry j 1-pIC 画分とした。

5. 仮性 IgA 免疫複合体の調製と投与実験

タンパク質としてカゼインを含む市販餌を摂取している 6-8 週齢の BALB/c マウスに、Cry j 1-pIC を 6 日間強制経口投与した。Cry j 1-pIC 最終投与の 1 日後にフロイントの完全アジュバンドとともに 50 μ g のスギ花粉混合液をマウスに腹腔免疫した。その後 2 週間おきに 2 回、50 μ g のスギ花粉混合液をフロイントの不完全アジュバンドとともに腹腔投与し、追加免疫を行った。初回免疫後 35 日目に眼窩静脈採血、63 日目に心臓採血を行い、得られた血清中の Cry j 1 特異的 IgG1 を測定した¹⁰⁾。また、仔マウスから採取した脾臓細胞を、10%の牛胎児血清を含む RPMI1640 培地に OVA 添加および無添加条件で培養した。培養上清中の IL-4 を市販の ELISA キット（サーモフィッシュサイエンティフィック）を用いて定量し、結果は Cry j 1 添加条件の IL-4 値から Cry j 1 無添加条件の IL-4 値を差し引いて示した。

6. 統計処理

統計学的な有意差を検定する際、母集団のデータが正規分布でない場合はマン・ホイットニ検定（両側検定）によって確認し、 $p < 0.05$ で有意差ありと判断した。ソフトは、4Steps エクセル統計第 2 版（オーエムエス出版）付属エクセルアドインソフト Statcel2 を用いた。

結果と考察

1. 唾液中の免疫複合体

20 歳代女性 3 名から、1 分間歯をみがいた後うがいをし、うがいの水分で唾液が希釈されないように 5 分待ってから舌下に脱脂綿を入れて 4 分間唾液を採取するという 10 分間のスケジュールを 4 回繰り返し、40 分間に 4 回の唾液を得た。オボアルブミン (OVA) 及びカゼインについて IgA-IC と特異的 IgA の変化を見たところ、個体差はあっても同一個体の試料内では両者がいつもほぼ同じ比率で存在していることが判明した (図 1)。したがって、ここで IgA-IC を形成している食品タンパク質は食事残渣のコンタミではないと考えられ、唾液中にも食品タンパク質・IgA-IC が分泌されていることが確認できた。今後、性差、年齢差、アレルギーの有無と関連づけて解析して行くことが重要と思われる。予備実験の結果ではあるが、ヒト涙にも唾液とほぼ同じ濃度範囲で IgA-IC の存在が確認できている。

以上の結果およびこれまでの結果より、食品タンパク質が外分泌液中に IgA 免疫複合体として分泌されることは、動物種、個体、食品タンパク質、外分泌液の違いに依存しない普遍的事実であることが明らかとなった。母乳同様食品タンパク質が IgA との免疫複合体として唾液や涙にまで存在することは、世界初の発見である。また、両外分泌液の成人 1 日における分泌量が唾液約 1.5~2L、涙約 2~3mLであることを考えると、涙中に分泌される絶対量としての IgA 免疫複合体の分泌量は微々たるものであるが、涙中の食品タンパク質・IgA 免疫複合体の存在は、食品タンパク質特異的 IgA 産生前駆細胞のホーミングに組織選択性が無いことを示唆している。

2. 唾液中からの免疫複合体の調製と投与

唾液に母乳より高濃度の IgA-IC が存在していることが判明したため、ヒトプール唾液 1L を 75%硫酸沈殿で濃縮してゲル濾過にかけ、OVA の IgA-IC が検出される画分を IgA-IC 画分として分取した (図 2)。さらにこの画分をプロテイン G カラムに供し、IgG

免疫複合体を除去したのち、マウス投与実験を行った。マウスのパイエル板 M 細胞 IgA レセプターは、ヒトの IgA-IC も区別せず取り込むことがわかっているため、種の違いによる影響は無視できると考えている。マウスへの IC 投与量として、マウス母乳中 OVA-IC の平均濃度 300ng/mL に、10 日齢の仔マウスにおける 1 日の哺乳量 0.5mL をかけたところ、IgA-IC 摂取量は 150ng/day となり、少し余裕をみて 200ng/day 投与することにした(図 3)。ここでの IgA-IC 量はすべて IgA 当量で示している。また、唾液 IgA-IC 画分の OVA・IgA-IC 量を 200ng/200 μ L としてマウスに投与した場合、そこに含まれる OVA を定量したところ 370ng になった。したがって、対照群にはこの量の OVA を遊離で与えることにした。また、唾液中には様々な食品タンパク質の IgA-IC が含まれていると考えられ、この投与量中に OVA だけでなく、OM の IgA-IC も 290ng 含まれていた。以上で示した投与量で、ヒト唾液 IgA-IC 画分もしくは遊離 OVA を 8 週齢の Balb/c マウスに 6 日間経口投与した後、IgE 応答を活性化させる免疫助剤である水酸化アルミニウム (Alum) とともに、卵白タンパク質を 2 回免疫し、得られたマウス血清中の OVA および OM に対する IgG1 を定量した。結果は、どちらの抗原に対しても、対照群と比べて IgA-IC 投与群で IgG1 産生に抑制が見られた(図 4)。よって、遊離の状態よりも母乳や唾液中に含まれる IgA-IC の方が直接的な経口免疫寛容の誘導因子であることを示すことができた。

3. Cry j 1-pIC (pseudo Immune Complex) の作製

唾液から調製した天然の IgA-IC 画分には IgA-IC 以外の寛容誘導因子が入っている可能性がある。したがって次なる課題は、純粋な IgA 免疫複合体を直接マウスに投与することにより経口免疫寛容の成立の如何を調べてこの仮説を立証すること、またその応用として IgA 免疫複合体をワクチンとして利用したアレルギー治療法の確立を検討することである。我々はそのためにマウス IgA モノクローナル抗体を作製し、人工的な IgA 免疫複合体 (pIC) の調製を試み、既に OVA で pIC の寛容誘導剤としての有

効性を証明している⁹⁾。

本研究では pIC のアレルギー予防・治療に対する新たな Drug Delivery System としての応用の可能性を探るため、木津らによって作製されたマウスモノクローナル IgA に、代表的なスギ花粉抗原である Cry j 1 を Sulfo-LC-SPDP を用いて化学結合させ、pIC による花粉症の予防の可能性を試みた⁹⁾。得られた Cry j 1-pIC に関しては、抗 Cry j 1 抗体と抗マウス IgA (α) のサンドイッチ ELISA が成立したことから、Cry j 1-pIC が形成されていることを確認した。

4. Cry j 1-pIC による花粉症の予防の可能性の検討

タンパク質としてカゼインを含む市販餌を摂取している BALB/c マウスに、Cry j 1-pIC を強制経口投与し、追加免疫後に得られた血清中の Cry j 1 特異的 IgG1 を測定した。対照として、投与した pIC 中の IgA 相当量と等量の IgA に架橋試薬無しで遊離 Cry j 1 を混ぜた混合液を投与した (Cry j 1-pIC に含まれる最大量の Cry j 1)。pIC 0.1 μg 群で有意に IgG1 産生の抑制がみられ、Cry j 1-pIC によって経口免疫寛容が誘導されることが示された (図 5)。pIC 1.5 μg 投与群では、IgG1 産生の抑制は見られなかったが、サイトカインレベルで見ると、pIC 群の両群で対照群よりも Cry j 1 依存 IL-4 分泌量が有意に低下しており、免疫寛容の誘導が示唆された。今後、架橋剤の種類 (IgA と抗原との結合方法)、IgA に結合させる抗原の量などを検討し、より有効な寛容誘導剤 (ワクチン) の開発へと繋げたい。

5. 唾液を用いたアレルギー検査法の開発

小児の IgA 欠損症では、約半数がアレルギー性鼻炎、喘息、蕁麻疹、アトピー性湿疹を伴っており、これらの合併率は正常児の 3 倍にも至るとされる²⁾。また、Lúdvíksson らは、アレルギー性鼻炎やアトピー性湿疹の症状を持つ乳幼児において唾液中の IgA が低下していることを報告している¹¹⁾。これらのことから、IgA の存在がアレルギー

に対して予防的に機能していることがうかがえる。現在、免疫力の指標として総 IgE と並んで総 IgA が測定されるようになってきている。一方、個々の食物アレルギーを評価するために特異的 IgE が測定されるが、特異的 IgA の測定には至っていない。また最近では、「アレルギーコンポーネント」といって、同じ食品に対するアレルギーを持つ患者でもアレルゲンとなる食品中の個々のタンパク質に対する反応性は多種多様であることが報告されている¹²⁾。たとえば、小麦製品を食べて 2 時間以内に食物依存性運動誘発アナフィラキシーを起こす患者において、従来の RAST 法では小麦陰性であることがあったが、ω グリアジン陽性の者が多いことが判ってきている¹³⁾。同様のアレルゲンとして小麦以外にも、大豆、桃などが問題視されている。そこで、個々のアレルゲン特異的な抗体の診断への重要性や、臨床症状と合致した検査方法の需要が高まってきている。唾液中の食物抗原特異的 IgA と食物アレルギーの関係についての述べている論文も散見されるが^{14,15,16)}、免疫複合体については報告がない。今後これらの変動要因や、食物アレルギー臨床、特異的寛容誘導との関連を明らかにして行くことが重要であろう。

唾液は性、年齢を問わず、連続的に容易に採取可能な生体試料であり、唾液をモニタリングの試料として用いれば、無痛、無侵襲に、かつ医療従事者に限らず様々な試験を行うことが可能になる。唾液を用いたアレルギー検査法の開発に期待したい。

6. 今後に向けて

我々はこれまでに、母乳中の IgA 免疫複合体による経口免疫寛容の誘導、食物アレルギーの予防というアイデアを提唱してきたが、本研究により、IgA 免疫複合体が母乳のみならず外分泌液中に普遍的に存在することが明らかとなった。今後の課題として、食品を摂取してから外分泌液中に IgA 免疫複合体として分泌されるまでの過程についても興味を持たれる。一般に、栄養学的には経口摂取したタンパク質はジペプチドあるいはアミノ酸まで分解されて吸収されると言われているが、免疫学的には経口

摂取された食品タンパク質の約 10 万分の 1 量が未消化のまま体内に取り込まれることが報告されている¹⁷⁾。腸管上皮のパイエル板 M 細胞は元より高分子の物質をトランスサイトシスにより体内に取り込む細胞である。IgA 免疫複合体を効率よく取り込む鍵となる IgA 受容体を発現しているこのパイエル板 M 細胞は、その細胞直下に免疫系を有する⁵⁾。このため取り込まれたタンパク質は抗原提示細胞によって分解されて提示され、速やかに免疫の活性化に使われる。これに対して近年、Jang らは、絨毛にも M 細胞を発見した¹⁸⁾。絨毛 M 細胞下には免疫系がなく、取り込まれたタンパク質は抗原提示細胞による分解を受けることはない。このいわゆる腸の穴とも言える絨毛 M 細胞は細菌をも通すと言われており、これが IgA 免疫複合体の形成に使われる食品タンパク質の取り込み口になっているのではないかと想像される。しかしながら、取り込まれたタンパク質が免疫系を感作せずに体内を巡り体外に分泌されるまでの過程には、まだ何か驚くべきメカニズムが隠されているかもしれない。こうして取り込まれた食事由来タンパク質をリサイクルして外分泌液中に IgA 免疫複合体として分泌し、常に自ら免疫系の活性化を行う機構が本来我々には備わっているのではないだろうか。母乳および唾液中の IgA 免疫複合体が、我が子および自分自身のための食物アレルギー予防の天然の飲むワクチンであることの証明を目指していきたいと考えている¹⁹⁾ (図 6)。

引用文献

- 1) 中村桂子,松原謙一監訳「細胞の分子生物学」 第5版, NEWTON PRESS, 1552-1561 (2010)
- 2) 寺井格,小林邦彦:名倉宏編「別冊・医学のあゆみ 食物アレルギーの最前線」,57-62 (1999)
- 3) Hirose J, et al. Biosci Biotechnol Biochem. 65(6),1438-1440 (2001)
- 4) Mantis NJ, et al. J Immunol. 169(4),1844-1851. (2002)
- 5) Corthésy B. J Immunol. 178(1),27-32. (2007)
- 6) 成田宏史,廣瀬潤子,北畠直文,日本栄養食糧学会誌, 55(4), 235-237 (2002)
- 7) 廣瀬潤子,木津久美子,成田宏史,化学と生物 45(4),230-232 (2007)
- 8) 成田宏史: 小林陽之助,金子一成編「食物アレルギーの治療と管理」(改訂第2版), 診断と治療社,218-224 (2008)
- 9) 木津久美子,廣瀬潤子,山口(村上)友貴絵,成田宏史,京都女子大学食物学会誌, 64, 1-9 (2009)
- 10) Kizu K, et al.,Food and Nutr Sci. 6,221-233 (2015)
- 11) Lúdvíksson BR, et al. : Clin Exp Allergy, 35(1):64-69 (2005)
- 12) 宇理須厚雄: 臨床免疫・アレルギー, 62, 390-394 (2014)
- 13) Matsuo H, et al. J Biol Chem. 279(13),12135-12140. (2004)
- 14) Rumbo M, et al. Clin Exp Immunol. 112,453-458 (1988)
- 15) Bottcher MF,et al, Clin Exp Allergy, 32,1293-1298 (2002)
- 16) Kulis M, et al. J Allergy Clin Immunol. 129(4),1159-1162 (2012)
- 17) 松田幹: 山田耕路編「食品成分のはたらき」,朝倉書店,15-29 (2004)
- 18) Jang MH, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(16),6110-6115. (2004)
- 19) 成田宏史,日本食品科学工学会誌, 61(9),450-454 (2014)

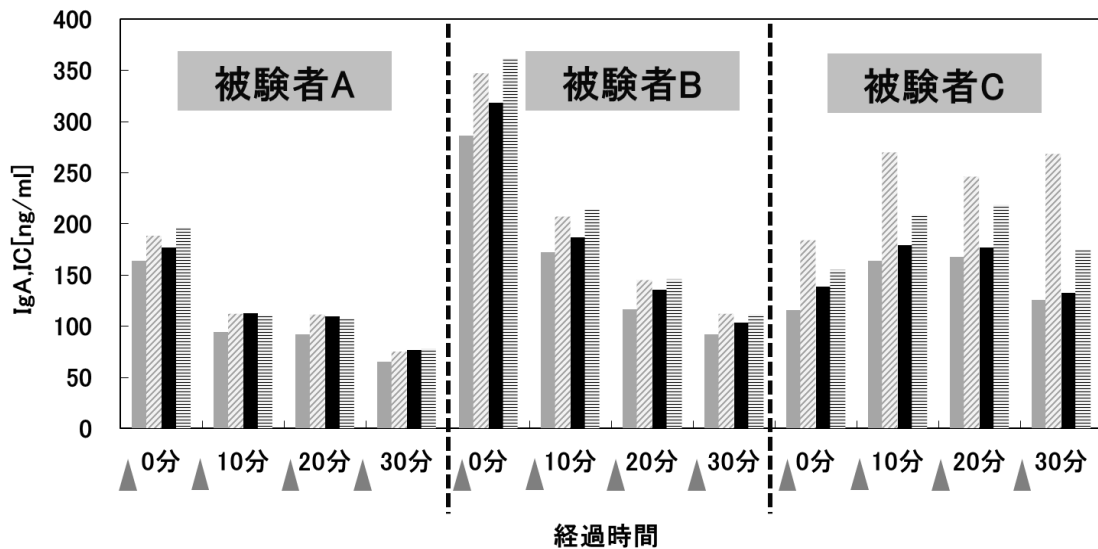


図 1. 唾液中の食品タンパク質特異的 IgA および IgA 免疫複合体

20 歳代女性 3 名から、1 分間歯をみがいた後うがいをした後 5 分間待ってから舌下に脱脂綿を入れて 4 分間唾液を採取するという 10 分間のスケジュールを 4 回繰り返し、40 分間に 4 回の唾液を得た。それぞれの唾液中の OVA・IgA-IC (灰色塗りつぶしバー), OVA 特異的 IgA (斜線バー), カゼイン・IgA-IC (黒色塗りつぶしバー), カゼイン特異的 IgA (横線バー) を測定した。図中の▲は、歯磨きとうがいをを行ったタイミングを示した。

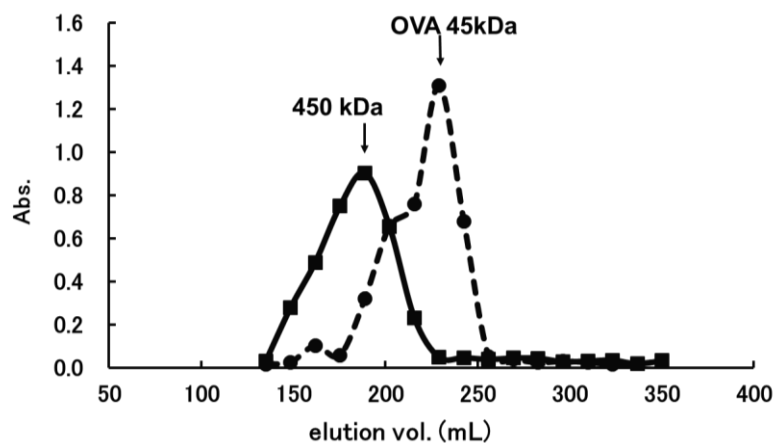


図 2. プール唾液のゲルろ過分画

ヒトプール唾液をゲル濾過にかけ、OVA の IgA-IC が検出される画分を IgA-IC 画分として分取した。ゲルろ過画分中の OVA-IC (■, 実線) および遊離の OVA (●, 破線) を ELISA 法で定量した。遊離の OVA を除去した 154~235ml のフラクションを IgA-IC 画分とした。

マウス母乳哺育実験における仔マウスのIC摂取量	
＝マウス母乳中OVA-IC濃度(IgA当量) × 仔マウス哺乳量/day	
＝ 300ng/mL × 0.5mL	
＝ 150ng/day ≒ 200ng/day	
	マウス投与量200 μ L中含有量
OVA-IC	200ng(IgA当量)
OVA	370ng
OM-IC	290ng(IgA当量)

図 3. 唾液 IgA-IC 画分の OVA・IgA-IC 量

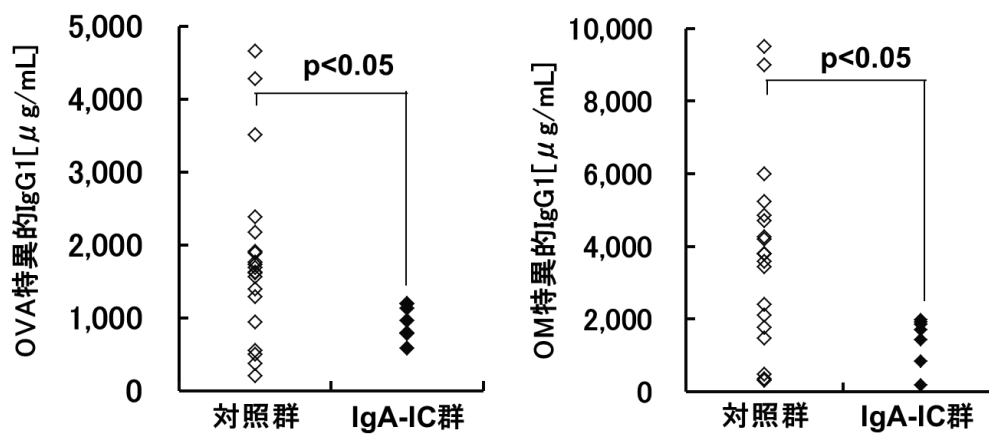


図 4. OVA および OM 特異的 IgG1 産生

唾液中 IgA-IC 画分を投与した試験群と対照群について、OVA を免疫後、血清中の OVA および OM 特異的 IgG1 を測定した。

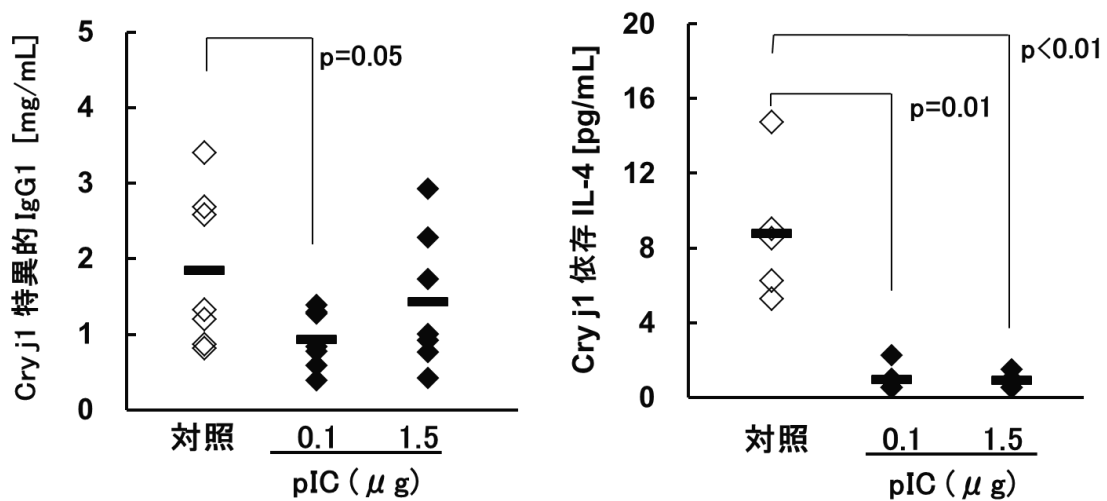
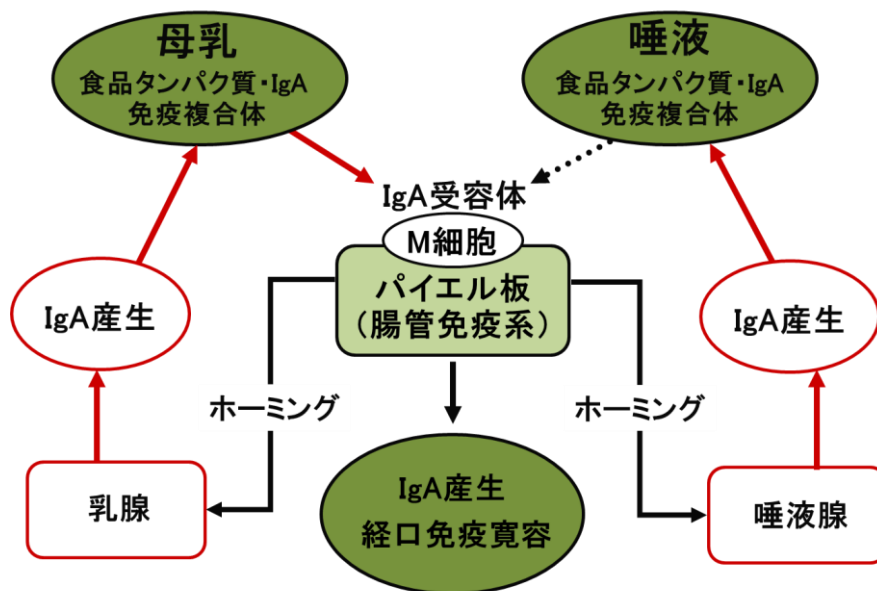


図 5. Cry j 1-pIC による経口免疫寛容の誘導

8 週齢の BALB/c マウスに、試験 (C) 群には IgA 当量で 0.1、1.5μg の pIC を 6 日間強制経口投与し血清中 Cry j1 特異的 IgG1 と脾臓細胞分泌 Cry j1 依存 IL-4 を測定した。



Natural Drinkable Vaccine

図 6. 外分泌液中の IgA 免疫複合体の意義

第3章 不完全 IgA 欠損症の発見

要 約

女子大生の唾液中の IgA-IC を個別解析した中で、総 IgA 濃度が特別低値を示す被験者を見出し、この被験者が IgA 欠損症である可能性が考えられた。そこで本被験者の血中 IgA を測定した結果、IgA 欠損症ではなかったものの、健常人の 95% が該当する基準値は下回っており、本被験者は不完全 IgA 欠損症ではないかと思われた。さらに父親と父方の祖母において同様に血中 IgA の低値傾向が見られ、遺伝要因の関与が疑われた。そこで、IgA のクラススイッチに関与する遺伝子を中心に遺伝子解析を委託した結果、本被験者と父親に共通する変異は見られなかった。現在さらに全ゲノム解析により本被験者と父親、父方の祖母に共通するミスセンス変異の検索を行っている。

本研究より、血液検査ではなく、無痛無侵襲で誰でも採取できる唾液中 IgA 測定によって IgA 欠損症のスクリーニングや検査ができる可能性が示唆された。

はじめに

唾液は、ヒトの歯および口腔粘膜の健康を維持するために欠かせない外分泌液である。唾液中には外界から侵入してくる異物に対する防御因子として全アイソタイプの免疫グロブリンが確認されているが、その比率は血清中に見られるものとは異なり、大唾液腺における抗体産生細胞のうち約 80% は IgA 産生細胞が占める¹⁾。また血清中の IgA は多くが単量体で、サブクラス(IgA1 と IgA2)のうち IgA1 が 9 割を占めるのに対し、唾液中の IgA は多くが J 鎖で結合された二量体もしくは多量体 IgA に、分泌成分がさらに結合した分泌型(Secretory IgA; sIgA)で存在し、IgA2 サブクラスの割合が約 4 割に増える²⁾。血清から唾液中へ誘導される IgA は 10% に満たない程度で、通常唾液中に見られる IgA のほとんどが唾液腺の免疫細胞によって産生されている¹⁾。その産生過程は、第一段階として、唾

液腺の IgA 産生形質細胞から、J 鎖を含んだ二量体の IgA が産生され、続く第二段階として、唾液腺の腺管内上皮細胞の基底膜側に発現された多量体免疫グロブリン受容体 (polymeric Ig receptor; pIgR) と二量体 IgA が複合体を形成して同細胞内を輸送されている。そして、その過程で切断される pIgR の一部が分泌成分となり、sIgA として唾液と混合して口腔内に分泌される²⁾。

また、そもそも唾液腺の IgA 産生細胞は、消化管関連リンパ組織などの免疫誘導組織で、抗原刺激を受けて誘導・活性化され唾液腺までホーミングされたものである。そして、免疫誘導組織での IgA 産生形質細胞の誘導・活性化を担うのが、活性化誘導シチジン脱アミノ酵素 (activation-induced cytidine deaminase; AID) による IgA クラススイッチである^{2,3,4)}。この IgA 抗体のクラススイッチ組み換えには、T 細胞に依存した経路と依存しない経路の 2 つの誘導経路がある⁵⁾。T 細胞に依存した経路では、細菌由来毒素や病原体の中和を行う高親和性 IgA 抗体が産生される。この誘導には CD4⁺T 細胞に発現された CD40 リガンドが B 細胞の CD40 を刺激することが必須で^{6,7)}、TGF- β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 といったサイトカインからのシグナルと合わさることで IgA 産生が誘導または増強される⁸⁾。一方、T 細胞に依存しない IgA クラススイッチでは低親和 IgA 抗体が産生されるが、その過程では、微生物由来の Toll-like receptor リガンド、樹状細胞から放出される B 細胞活性化因子 (B cell activating factor of TNF-family; BAFF) や増殖誘導リガンド (a proliferation-inducing ligand: APRIL) からの刺激が関与する^{6,7)}。また、BAFF や APRIL による IgA クラススイッチ組み換えは、TGF- β , IL-5 の存在下で誘導され、この経路には膜貫通活性化因子やカルシウム変調サイクロフィリンリガンド相互作用蛋白 (TACI), 加えて BAFF と APRIL の受容体である BAFF-R, BCMA が関わる⁹⁾。高親和性 IgA の免疫応答が起こるまでには 5~7 日かかるため、低親和性 IgA はその間の防御機構や共生細菌の粘膜表面への到達阻止を担う⁷⁾。免疫誘導組織では、このような多様な因子による制御を受け IgA クラススイッチ組み換えが起こり、IgA 産生細胞がつくられている。

一方、私たちはヒト唾液中に分泌型 IgA が食品タンパク質との免疫複合体 (IgA-IC) とし

て存在すること、IgA-ICが経口免疫寛容の誘導因子として機能していることを明らかにし、唾液中食物抗原特異的IgAに着目してきた^{10,11,12)}。そしてこれまでに、約500名の女子大生ボランティアから唾液を提供してもらい、唾液中IgAを個別解析して基礎データを集めてきた。しかしその中で、IgAが特別低値を示す被験者が見付かった。私たちはこの被験者がIgA欠損症の疑いがあると考えて、さらに詳細な唾液測定、さらに血液検査と遺伝子解析を行ったのでその結果を報告したい。

試料および方法

唾液中IgA測定にはELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)を用いた。血液検査は株式会社エスアールエルに、遺伝子解析は長浜バイオ大学バイオサイエンス学部の新蔵礼子教授の研究室に、それぞれ測定を委託した。

1. 唾液の採取および処理

本研究では、無刺激の全唾液を試料として採取した。唾液試料への食事残渣の混入を防ぐために、唾液採取は食後を避けて行うこととした。さらに、唾液採取前には研磨剤を付けずに約3分間、舌下も含めて出血しないように歯を磨いた後、水道水で十分うがいをした。うがい後は水道水によって唾液が薄まっているので、すぐに唾液採取を開始せずしばらく待ち、きれいに洗った手で脱脂綿を折りたたんで舌下に入れた。3分後、唾液を吸収した脱脂綿をきれいな手で取り出し、15mL遠心チューブに入れて直ちに凍結し、IgA測定まで-20℃で保存した。測定時に試料を緩慢解凍し、15mL遠心チューブの蓋を脱脂綿の端をかませた状態で閉め、10,000g×10分、4℃で遠心することにより唾液を回収し、沈殿した夾雑物を除いた上清を唾液試料とした。

以上の試料採取は、京都女子大学臨床研究倫理審査委員会の許可を得た上、協力者に研究の趣旨を説明し、十分な研究の理解と研究協力の同意を得て行った。

2. 唾液試料中の IgA の測定

唾液試料中の総 IgA, IgA1, IgA2, 分泌型 IgA および食品タンパク質・IgA 免疫複合体をサンドイッチ ELISA, 食品タンパク質特異的 IgA を固相 ELISA により測定した。また、いずれの方法においても測定に用いた検量線から検出限界値を算出し、唾液試料の測定結果が検出限界値以下だった場合、検出限界値を代入して示した。

2-1) 総 IgA, IgA1, IgA2 の測定 抗ヒト IgA (α) (Zymed Laboratories 社製)もしくは抗ヒト IgA1 (Gene Tex 社製), 抗ヒト IgA2 (AbD Serotec 社製)を 0.25 μ g/ウェルで 96 穴プレート (Nunc 社製)に固相化後, 1%牛血清アルブミン (BSA) 添加リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline; PBS, 10mM NaPi, 0.15M NaCl, 0.02% NaN₃, pH 7.4) によりブロッキングした (37°C 1 時間, もしくは 4°C 一晩)。その後, 一次反応として唾液試料を 37°C で 1 時間反応させ, 続いて, 0.1% BSA 添加 T-TBS (0.05% Tween20 入りトリス緩衝食塩溶液 (Tris Buffer Saline : TBS, 10mM Tris-HCl Buffer, 0.15M NaCl, pH 7.4)) で 0.1 μ g/ml に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgA (α) (American Qualex Antibodies 社製) 50 μ L/well を 37°C で 1 時間反応させた。最後に, p - ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として反応させ, 405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (iMark, Bio - Rad 社製)を用いて測定した。この時, 標準物質にはヒト sIgA (Cappel, MP Biomedicals 社製)もしくはヒト IgA1 (Acris Antibodies 社製), ヒト IgA2 (Acris Antibodies 社製)をそれぞれ用い, 一次反応時に 0~200ng/mL の濃度で反応させ, 得られた検量線を用いて試料中の濃度を求めた。したがって, 測定値はそれぞれヒト sIgA, IgA1, IgA2 相当量として示した。

2-2) 総分泌型 IgA の測定 固相化抗体と唾液中の抗原との一次反応までは総 IgA の測定と同様に行い, 二次反応として 0.1% BSA/T - TBS 溶液で 7000 倍希釈したビオチニル化 Goat anti Human secretory component (Nordic-MUBio 社製)を 37°C で 1 時間反応させた。さらに ALP 標識ストレプトアビジン (Southern Biotech 社製)を 0.1% BSA/T - TBS 溶液で 8000 倍希釈して結合させた後, p - ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質として反

応させ、405nm における吸光度を測定した。標準物質にはヒト sIgA を用いた。

2-3) 食品タンパク質・IgA 免疫複合体の測定 卵白タンパク質であるオボアルブミン (OVA) および牛乳タンパク質であるカゼインについての IgA 免疫複合体を測定した。すなわち、抗 OVA ポリクローナル抗体 (Cappel, MP Biomedicals 社製)、もしくは抗カゼインポリクローナル抗体(森永生科学研究所より供与)を PBS で 5 μ g/mL に調整して、50 μ L/ウェルで固相化した後、1%BSA/PBS によりブロッキングしたプレートに、試料を 50 μ L 供し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。その後は、総 IgA の測定と同様に行った。また、各 IgA 免疫複合体の標準品は市販品として存在しないため、検量線は総 IgA と同じ条件で作製した。よって、本研究における IgA 免疫複合体量は sIgA 相当量で示した。

2-4) 食品タンパク質特異的 IgA の測定 OVA (SIGMA, Grade V) もしくは α -カゼイン (SIGMA) をそれぞれ 5 μ g/ml, 50 μ L/well で固相化し、1%BSA/PBS によりブロッキングした。その後は、IgA 免疫複合体の測定と同様に行った。よって、本研究では特異的 IgA も sIgA 当量として示している。

結果および考察

1. 唾液中 IgA 測定による AD の発見

女子大生ボランティア (20~21 歳) の唾液中総 IgA を測定した中で、総 IgA 値が特別低値の被験者 No.12 が見付かった (図 1)。表に示した 21 名の総 IgA の平均値は 178 μ g/mL、中央値は 164 μ g/mL であったが、No.12 は 17 μ g/mL であった。我々はこの被験者が IgA 欠損症の可能性があると考え、この被験者のことを IgA Deficiency より、以下 AD と呼ぶことにした。

図 1 の結果を受け、AD の唾液中 IgA の再測定を行った (図 2)。唾液中 IgA は朝が最も高く、夜に向かって低くなるという日内変動が見られる。そこで AD に朝食前、昼食前、夕食前もしくは夕食 2 時間後以降の 1 日 3 回、3 日間唾液を採取してもらった。その結果、総 IgA に加えて総分泌型 IgA 濃度も、いずれの時間帯、項目においても同年代の対照に

比べて低い傾向を示した。唾液への IgA 分泌機構に異常があれば分泌型 IgA の極端な低値が観察される可能性が考えられたが、そのような傾向は見られなかった。さらに、OVA もしくはカゼインに対する特異的 IgA および IgA-IC は、特に昼と夜に採取した唾液では、現在の定量系の検出限界値を下回るほど少なかった。また、IgA には IgA1, IgA2 の 2 つのサブクラスがあり、IgA 欠損症の中にはいずれかのサブクラスのみが欠損する症例も報告されている¹³⁾。そこで唾液中総 IgA1 および IgA2 も測定した結果(図 3)、いずれかが極端に低値を示す傾向はなかったものの、対照に比べるといずれも低かった。また、対照では IgA2 に比べて IgA1 が高濃度である場合が多いが、AD ではほぼ同程度に検出された。この産生比の違いについては今後さらなる検討が必要であると思われる。

以上のように、唾液中 IgA については、唾液を採取した時間帯、測定項目を問わず全体的に低濃度である傾向が見られた。またこの傾向は、唾液中 IgA の濃度を唾液分泌量で除した「分泌速度」の結果や、唾液中 IgA 濃度を唾液中たんぱく質濃度で除して唾液分泌量の影響を考慮した結果においても同様であった(データ非表示)。

2. 血中 IgA 検査

表 1 に IgA 欠損症の特徴について示した。IgA 欠損症の診断基準は、「血中 IgA 値が 10mg/dL 以下」¹⁴⁾であり、易感染性、アレルギーや自己免疫疾患などを併発することもあるが、多くの患者は無症候である。わが国の患者数は 3000~19000 人に 1 人と欧米での頻度(200~2000 人に 1 人)に比べて少ないが¹³⁾、症状が顕在化することが稀であるため、潜在的な患者数はもっと多く存在する可能性もある。また、人種間で頻度が異なる点からも予想されるように、IgA 欠損症は原発性免疫不全症(遺伝性の免疫疾患)のひとつである。そこで AD の両親にも唾液を採取してもらい、IgA を測定したところ、AD ほどではなかったものの、父親においても唾液中の IgA が低い傾向が見られた(図 4)。

AD 自身は現在のところ自覚症状はなく健康だが、もし IgA 欠損症だった場合、妊娠や加齢、環境の変化などによるストレス等が引き金となり症状が現れる可能性もある。また、

輸血によって IgA に対する抗体がつくられてしまうと、再度輸血された際にアナフィラキシーショックを起こす危険もあり、AD 本人にとっても IgA 欠損症であるか否かを知っておくことは有益である。そこで、AD および AD の両親に血液検査を受けてもらった(表 2)。その結果、AD の IgA 値は 81mg/dL であり、IgA 欠損症ではなかったが、健常人の 95%が該当する基準値(110-410mg/dL)を下回っており、不完全 IgA 欠損症であると考えられた。また、通常 IgA 欠損症の多くは IgG, IgM や IgD など他のクラスの抗体に異常はなく、むしろ他のクラスの抗体が IgA の機能を代替することが知られているが^{2, 13)}、AD は IgG も基準値を下回っていた。さらにこの傾向は父においても同様に見られた。一部の患者では血中 IgG2 抗体の欠損が合併する症例の報告¹⁵⁾もあるが、本研究では各抗体のサブクラスまで測定しておらず、今後さらに詳細な測定が必要であると考ええる。本結果より、AD の IgA 低値は父からの遺伝的要因が疑われたので、父方の祖父母の血液検査も行ったところ、祖母において AD と父同様血中の IgA が基準値以下であった。また、IgA 欠損症患者では赤血球に対する自己抗体の有無を調べるクームス試験において陽性反応(自己抗体あり)が見られることも知られており、AD についても間接クームス試験を行ったところ、赤血球に対する抗体が検出された。間接クームス試験が陽性だったのは AD 本人のみであったが、今回の血液検査で AD が自己免疫疾患傾向にあることも明らかになった。

3. AD およびその家族の遺伝子解析

血液検査の結果より、AD における血中および唾液中 IgA の低値が遺伝的要因によって生じていたことが判明したため、原因遺伝子の特定のために AD とその両親について IgA クラススイッチに関連する遺伝子を中心に遺伝子解析を委託した(表 3)。クラススイッチ異常症の候補遺伝子として挙げられた AID, CD40, UNG, IgA^{2, 3, 4, 16)}のコード領域にはアミノ酸変異を伴う病的変異は認められなかった。次に、IgA へのクラススイッチに関与する TACI, BAFF-R, BCMA, BAFF, APRIL について解析した。TACI, BAFF-R, BCMA は樹状細胞を通して IgA へのクラススイッチを誘導する経路の上流にある膜結合

型受容体であり, BAFF, APRIL はそのリガンドである^{6,7,9,16)}。AD の上記 5 つの遺伝子解析の結果, BAFF, BAFF-R には病的変異は認められなかったが, TACI(P251L), BCMA(N81S), APRIL(G67R)となるミスセンス変異が認められた。

この 3 つの変異について両親の遺伝子解析も行い, AD と父親で共通し, 母親では遺伝子型が異なる遺伝子を探したが, いずれも AD と父親では共通せず, 表現型と遺伝子型は一致しなかった。

今回 AD に変異が見付かった TACI, BCMA, APRIL の 3 つの遺伝子変異は, すべて SNP(Single Nucleotide Polymorphism)として NCBI データベースに登録されており, 集団の 1%以上が同部位に変異アレルを持つことになる。したがって上記の変異が単独で不完全 IgA 欠損症の病態に関与している可能性は低いかもしれない。しかし, APRIL(G67R)については, 全身性エリテマトーデスに対する疾患リスクを示唆する報告がある¹⁷⁾。またこの変異は, 極性アミノ酸(グリシン)が非極性アミノ酸(アルギニン)に代わる変異であり, タンパク質の立体構造を大きく変えている可能性がある。APRIL が正常に機能しない場合, 樹状細胞依存のクラススイッチ経路の一端を崩されたことになり, IgA 産生の低下につながる可能性も考えられる。

4. 今後に向けて

本研究では, 唾液中の IgA の解析から不完全 IgA 欠損症の発見に至った。これまで IgA 欠損症は血中 IgA 測定によって診断されてきたが, 今後は唾液中 IgA 測定によって IgA 欠損症を簡易的にスクリーニングできる可能性が示唆された。それが実現できれば, IgA 欠損症の潜在的な患者が見付かるきっかけになったり, 病態解明に貢献したりできるかもしれない。

また, AD における IgA の低下は, 複数の遺伝学的要因と環境要因が重なって生じている可能性もあるが, AD, 父, 祖母において表現型が比較的合致していることから, 単一遺伝子が原因の可能性も否定できない。現在, 引き続き全ゲノム解析から AD の IgA の低値

の原因遺伝子解明を試みている。

引用文献

- 1) 石川達也,高江洲義矩監訳: 唾液の科学(第1版),p165-212 (2006)
- 2) 清野宏編: 「臨床粘膜免疫学」, 株式会社シナジー, p246-65 (2010)
- 3) Mestecky J *et al.*, “Mucosal Immunology”, 4th ed., Elsevier/Academic Press, p429-54 (2015)
- 4) Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T., Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, **102**, 553-63 (2000)
- 5) Macpherson AJ, McCoy KD, Johansen FE, Brandtzaeg P., The immune geography of IgA induction and function., *Mucosal Immunol.*, **1**, 11-22 (2008)
- 6) Cerutti A, Rescigno M., The biology of intestinal immunoglobulin A responses., *Immunity.*, **28**, 740-50 (2008)
- 7) Suzuki K, Fagarasan S., Diverse regulatory pathways for IgA synthesis in the gut., *Mucosal Immunol.*, **2**, 468-71. (2009)
- 8) Cerutti A., The regulation of IgA class switching., *Nat Rev Immunol.*, **8**, 421-34. (2008)
- 9) Schneider P., The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation., *Curr Opin Immunol.*, **17**, 282-9. (2005)
- 10) 木津 久美子, 廣瀬 潤子, 本庄 勉, 成田 宏史 (2012) 母乳哺育により母ラットの摂取タンパク質特異的に仔ラットの Th2 応答が抑制される. 日本栄養・食糧学会誌, 65: 13-19.
- 11) Kumiko Kizu, Ayu Matsunaga, Junko Hirose, Akihiro Kimura, Hiroshi Narita Induction of Oral Tolerance in Neonatal Mice by Transfer of Food Allergens as IgA-Immune Complexes in Breast Milk. *Food and Nutrition Sciences.*, **6**: 221-33. (2015)
- 12) 木津久美子, 廣瀬潤子, 山口 (村上) 友貴絵, 木村彰宏, 成田宏史: 京都女子大学食物学会誌, **64**, 5-12 (2009)

- 13) 金子英雄, 鈴木啓子, 近藤直実 : IgA・IgA サブクラスと IgA 欠損症の病態, 日本臨床免疫学会会誌, **32(3)**, 142-8 (2009)
- 14) Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, Hammarström L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck JM, Roifman C, Seger R, Wedgwood J; Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol.* , **120(4)**, 776-94 (2007)
- 15) Mestecky J *et al.*, “Mucosal Immunology”, 4th ed., Elsevier/Academic Press, p1442-59 (2015)
- 16) Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, Hammarström L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck JM, Roifman C, Seger R, Wedgwood J; International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee., Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee., *J Allergy Clin Immunol.*, **120(4)**, 776–794, (2007)
- 17) Lee YH, Ota F, Kim-Howard X, Kaufman KM, Nath SK., APRIL polymorphism and systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility., *Rheumatology (Oxford)*., **46(8)**, 1274-6 (2007)

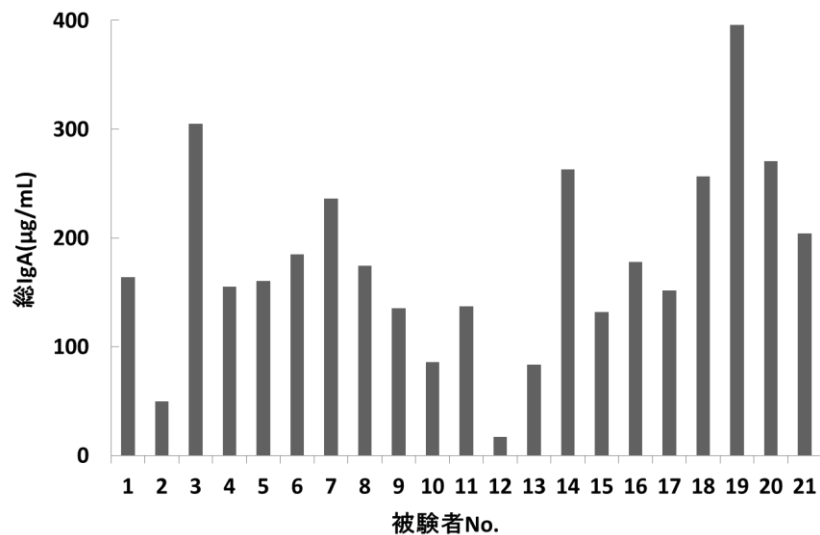


図 1. 唾液中総 IgA 測定

成人女性（20～21 歳）の唾液中総 IgA を ELISA 法にて個別測定した。

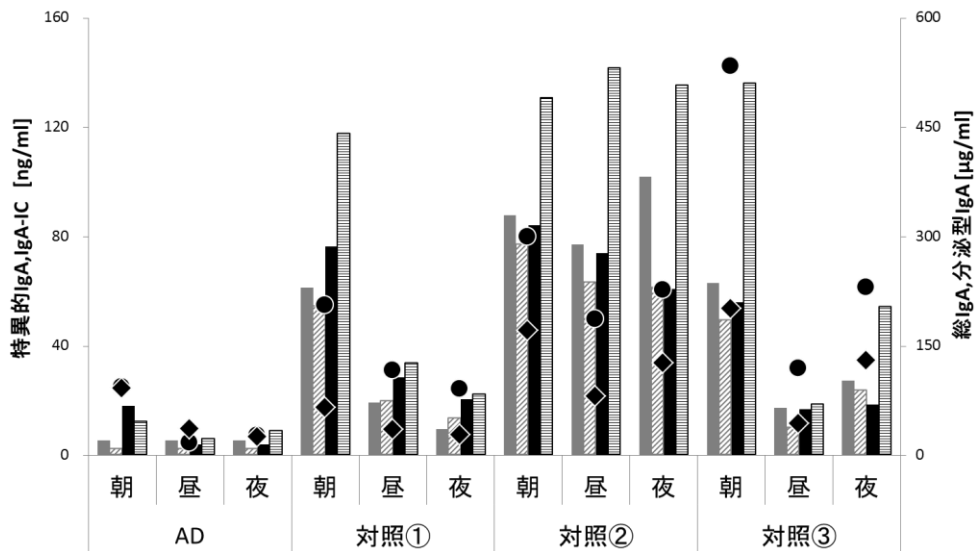


図 2. 採取時間別唾液中 IgA

AD および AD と同性・同年代の対照被験者①～③に、3 日間にわたって朝、昼、夜の 1 日 3 回唾液を採取してもらい、それぞれの唾液中 IgA を測定した。グラフは 3 日間の平均値を示した。OVA 特異的 IgA（■灰色塗りつぶしバー），OVA・IgA-IC（▨斜線バー），CASEIN 特異的 IgA（■黒塗りつぶしバー），CASEIN・IgA-IC（▨横線バー）は第一軸（左側）で値を示し，総 IgA（●黒丸），総分泌型 IgA（◆黒ひし形）は第二軸（右側）で値を示した。

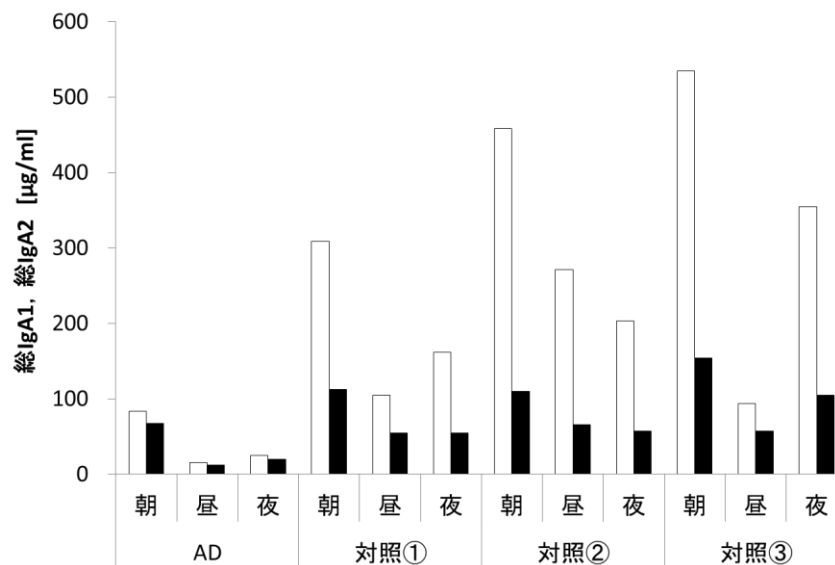


図 3. 唾液中 IgA1 および IgA2

AD および AD と同性・同年代の対照被験者①～③に、3 日間にわたって朝、昼、夜の 1 日 3 回唾液を採取してもらい、それぞれの唾液中総 IgA1 (□白バー) および総 IgA2 (■黒バー) を測定した。3 日間の平均値をそれぞれ示した。

表 1. IgA 欠損症とは

-
- 血清 IgA 値 $\leq 10\text{mg/dL}$
 - 多くの患者は無症候。一部は再発性感染、アレルギー、自己免疫疾患などを有することもある。
 - 患者数は、欧米では 200～2,000 人に 1 人
日本では 3,000～19,000 人に 1 人
 - 原発性免疫不全症 (遺伝性の免疫疾患)
 - 抗 IgA 抗体が生じ、輸血によるアナフィラキシー反応が起こることもある。
-

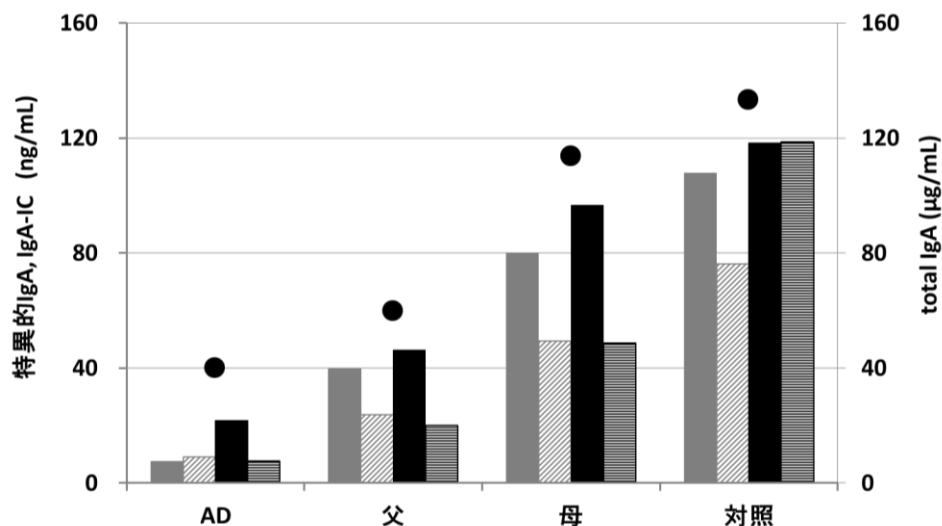


図 4. AD および両親の唾液中 IgA

AD および AD の両親,, 対照から採取した唾液中 IgA を測定した。OVA 特異的 IgA (■灰色塗りつぶしバー), OVA・IgA-IC (▨斜線バー), CASEIN 特異的 IgA (■黒塗りつぶしバー), CASEIN・IgA-IC (▨横線バー) は第一軸 (左側) で値を示し, 総 IgA (●黒丸), 総分泌型 IgA (◆黒ひし形) は第二軸 (右側) で値を示した。ELISA 法を用い, 結果はヒト IgA 相当量で示した。

表 2. 血液検査の結果

No.12 およびその両親、父方の祖父母の血清中抗体を委託測定した。赤血球に対する抗体の有無を調べる間接クームス試験も同時に測定した。基準値を満たさなかった値は下線で示した。

検査項目	基準値	AD	父	母	祖父	祖母
IgA(mg/dl)	110-410	<u>81</u>	<u>80</u>	193	198	<u>96</u>
IgG(mg/dl)	870-1700	<u>843</u>	<u>805</u>	1112	888	1065
IgM(mg/dl)	F46-260 M33-190	159	85	61	29	43
IgD(mg/dl)	9.0以下	0.6以下	0.6以下	1.5	1.0	0.6以下
IgE(IU/ml) (非特異的IgE)	173以下	62.3	5.0以下	49.5	79.2	5.0以下
間接クームス	(－)	<u>(＋)</u>	(－)	(－)	(－)	(－)

表 3. AD とその家族における IgA クラススイッチ関連遺伝子の変異

IgA クラススイッチ機構に関わる遺伝子を中心に AD と父母について遺伝子解析を行った。変異なし (×)，変異あり (ホモ) (○)，片側に変異あり (ヘテロ) (△)，未解析 (—) をそれぞれ示し，AD にミスセンス変異が見られた遺伝子については，() 内に変異箇所を示した。

解析項目	AD	父	母	ミスセンス変異の有無
IgA	×	×	×	なし
AID	×	×	×	なし
UNG	×	×	×	なし
CD40	○	△	△	あり(コザック配列)
TACI	○	△	○	あり(P251L)
BCMA	○	○	○	あり(N81S)
APRIL	○	△	○	あり(G67R)
BAFF	×	×	×	なし
BAFF - R	×	×	×	なし

第4章 ヒト IgA に対するイムノクロマトグラフィーの開発

要 約

唾液中 IgA の簡易検査法としてイムノクロマトグラフィーの開発を目指した。まず、抗ヒト IgA mAb 6 種を作製し、その中で固相化抗体および金コロイド標識抗体に適したものをそれぞれ検討した。目標検出感度は、これまで本研究室で唾液中 IgA を測定した中で最低値であった唾液 (17mg/mL; 3 章の不完全 IgA 欠損症の被験者の唾液) を目安にした。その結果、サンドイッチ ELISA での唾液中 IgA 測定の結果を反映する濃度依存的なバンドが検出でき、かつ感度の目安に用いた唾液ではバンドがほとんど目視できない、10 分間で反応が終了するイムノクロマト試薬を作製できた。今後応用として、食物抗原特異的 IgA や IgA-IC のイムノクロマト試薬を開発すれば、経口免疫寛容獲得の評価の為の新たな簡易検査法として利用できるかもしれない。

はじめに

腸管の粘膜固有層には全身に存在する形質細胞の約 70~80% を占める IgA 産生細胞が存在しており、その一部がホーミングによって遠隔の粘膜固有層や、乳腺、唾液腺、涙腺などの腺組織へも移行して IgA を産生する。IgA は全免疫グロブリン産生量の 60% 以上を占め、そのうちの 2/3 以上、1 日 3,000mg にも及ぶ分泌型 IgA (secretory IgA: sIgA) が粘膜表層に分泌され、体内に侵入する抗原や異物に対する最前線の感染防御に重要な役割を果たしている¹⁻³⁾。血清中では多くが単量体 (160kD) で存在するのに対し、初乳・乳・唾液など外分泌液中では分泌型 (約 410kD) で存在し、J 鎖と呼ばれる分子で結合された二量体に分泌成分 (secretory component: SC) が結合した状態になっている^{1, 2)}。

IgA には二つのサブクラス、IgA1 と IgA2 があり、IgA1 産生細胞と IgA2 産生細胞の分布には組織によって特徴がある。血清中では IgA1 が大部分を占めているのに対し (9:1)、分泌液中では IgA2 の割合が高くなる (6:4)⁴⁾。この二つのサブクラスを決定している H 鎖の $\alpha 1$ と

$\alpha 2$ の遺伝子間の相同性は 95%以上であるが、大きな違いは $\alpha 2$ 鎖のヒンジ領域では $\alpha 1$ 鎖と比較して 13 個のアミノ酸配列が欠如している点である。IgA はタンパク質分解酵素による分解に対して安定であるが、この構造の違いにより、IgA2はIgA1よりさらに細菌由来のタンパク質分解酵素に強くなっている⁵⁾。

本研究室では、これまでに食品タンパク質が特異的 IgA との免疫複合体 (IgA-Immune Complex: IgA-IC) を作って母乳中に存在していること⁶⁾、IgA-IC が食物アレルギーの発症予防因子として機能していることを明らかにしてきた^{7, 8)}。さらに我々は、IgA-IC は母乳だけでなく唾液にも存在していることを見出した⁹⁾。唾液は年齢・性別・妊娠の有無にかかわらず、無痛無侵襲で誰でも簡便に採取できるという利点があり、IgA-IC を研究する上で有用な試料になり得る。本研究ではその第一歩として、血液や母乳ではなく唾液を用いたヒト IgA に対するイムノクロマトグラフィーの開発を試みた。通常 IgA や IC の定量にはサンドイッチ ELISA が用いられているが、イムノクロマトグラフィーはサンドイッチ ELISA とクロマトグラフィーの原理を組み合わせた方法で、検査溶液をテストストリップに滴下し、一定時間反応後に判定ラインを読むだけという半定量的検査法であり、特殊な機材や技術が不要で短時間に結果を得ることが可能な簡便法として、医薬食品分野で汎用されるようになってきている¹⁰⁾。

試料および方法

1. 唾液の採取および処理

唾液採取は、食事残渣の混入を防ぐために食後 2 時間を避けて行った。さらに、唾液採取前には研磨剤を付けずに約 3 分間、舌下も含めて出血しないように歯を磨き、水道水で十分うがいをした。うがい後は水道水によって唾液が薄まっているので 3 分間待ち、きれいに洗った手で脱脂綿を折りたたんで舌下に入れた。5 分後、唾液を吸収した脱脂綿を取り出して直ちに凍結し、 -20°C で保存した。測定時に試料を緩慢解凍した後、15 mL 遠心チューブの蓋に脱脂綿をかませて落ちないようにした状態で蓋を閉め、 $10,000\text{g} \times 10$ 分、 4°C で遠心し、沈殿した夾雑物を除いた上清を唾液試料とした。

以上の試料採取は、京都女子大学臨床研究倫理審査委員会の許可を得た上、協力者（19～23 歳の健康な女性）に研究の趣旨を説明し、研究の理解と協力の同意を得て行った。

2. 唾液中 IgA の定量とモノクローナル抗体の作製

唾液中の IgA の定量は木津らの方法にしたがい、標準物質としてヒト sIgA（Cappel 社）を用いて行った⁹⁾。ヒト sIgA を抗原としたモノクローナル抗体の作製と純化、特異性の検討、サンドイッチ ELISA は基本的に Hirose らの方法にしたがって行った¹¹⁾。

なお、動物実験は、「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年文部科学省告示第 71 号）」に基づき、京都女子大学動物実験規定にしたがって行った。

3. イムノクロマトグラフィー

3-1) 金コロイド標識抗体の調製 予備検討によって、あらかじめ各抗体と金コロイド溶液を結合させる際の至適抗体濃度と pH を決定した。その結果に基づき、粒径 40nm, Abs (at 520nm) =1.0 の金コロイド液 (BBI Solutions 社) 0.9mL と pH6.5 の 50mM NaPi 0.1mL をよく攪拌し pH を調整した。この金コロイド液に、10mM NaPi (pH7) で 0.2mg/mL に調整した抗ヒト IgA モノクローナル抗体 1mL を攪拌しながらゆっくり滴下し、室温で 15 分間静置した。次に懸濁液 (10mM NaPi pH7 に 1% 牛血清アルブミン (BSA), 0.1% PEG20000 を添加) を 1mL 加えてよく攪拌し、2,500×g, 5 分, 4℃で遠心し、上清を捨てた。懸濁液 2mL を加え、30 秒の超音波処理で分散させ、さらに 2mL の懸濁液を加えて攪拌した後、2,500×g, 5 分, 4℃で再度遠心し、上清を捨てた。金コロイド用保存液 (10mM NaPi, pH6.5) 1mL を加え、10 分の超音波処理で分散させ、金コロイド標識抗体とした。

3-2) テストストリップの作製 ニトロセルロースメンブレン (Hi-Flow plus:180, 60mm×30cm, メルク社) にイムノクロマトディスペンサー (DCI-210, ZETA Corporation 社) を用いて、テストラインおよびコントロールラインとして下記のように各抗体を 1 μ L/cm ずつ塗布した。テストラインには、10mM NaPi, pH7 に溶解した抗ヒト IgA モノクローナル抗体 1mg/mL を用い、メンブレンの下端から 12mm の位置に塗布した。コントロールラインには抗マウス IgG+IgM(H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories 社) を 10mM NaPi, pH7 で 1mg/mL に希釈して、テストラインより 5mm 上端側に塗布した。37℃ 2 時間で乾燥させた後、1% BSA 添加 PBS にメンブレン全体を浸し、30 分間振とうしてブロッキングした。純水で 2 回洗浄し、0.05% Tween20 添加 Tris buffered saline (T-TBS) に 10 分間浸漬後再度純水で 2 回洗浄した。表面の水分を拭き取った後、室温で乾燥させ、コントロールラインに重ならないようにメンブレン上端に吸収パッド (ストリップ, 20mm×30cm, メルク社) を貼りつけた。使用時までデシケーターにシリカゲルと共にに入れて保存した。

3-3) テストストリップによるヒト唾液中 IgA の検出 96 穴プレート (住友ベークライト社) に、適当に希釈した唾液と金コロイド標識抗体を 1:3 の容量で加え、よく攪拌して反応させた。そこにテストストリップの下端を浸し、唾液・金コロイド標識抗体溶液がテストストリップ上端の吸収パッドに到達するまで展開させ (展開時間約 2 分間)、テストラインに発色が見られた場合を陽性とした。さらに、すべてのテストストリップでコントロールラインの反応が見られることを確認した。

結果および考察

1. イムノクロマトグラフィーの原理 (図 1)

イムノクロマトグラフィーの概略を図 1 に示した¹⁰⁾。イムノクロマトグラフィーは被検物質がセルロース膜上を毛細管現象でゆっくりと流れる性質を応用した免疫測定

法である。まず検体に含まれる抗原と金コロイド標識抗体が結合して免疫複合体を形成し、それがセルロース膜上を流れていく。そしてあらかじめ抗原を認識する固相化抗体（キャプチャー抗体）を塗布してあるテストライン上に到達した時に免疫複合体がトラップされ、金コロイドによる発色が見られる仕組みになっている。さらにテストラインの上流に抗 IgG 抗体を塗布しておく、過剰の金コロイド標識抗体がトラップされてコントロールラインとして発色するため、展開の終了を確認できる。

なお、ポリクローナル抗体を用いるとモノクローナル抗体に比べロット間差が大きくなってしまいうという問題や、金コロイド粒子の凝集が起こりやすいという欠点があるため、イムノクロマトグラフィーには再現性・特異性に優れ、凝集が起こりにくいモノクローナル抗体同士の組み合わせが適しているとされる。そこで、まずヒト IgA に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。

2. モノクローナル抗体の作製と純化

常法にしたがって市販のヒト sIgA を免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞と骨髓腫細胞との融合細胞の中から特異的抗体産生細胞をスクリーニングした結果、2 回のクローニングを経て最終的に①～⑥の計 6 抗体が得られた。IgA1, A2 に対する抗原特異性を解析した結果、IgA1 特異的なもの、両方に反応するものはあったが、IgA2 特異的なものはなかった（図 2）。これは IgA2 が IgA1 より基本的にはヒンジ領域で 13 残基小さいだけであること⁵⁾からも妥当である。抗体の大量調製のため、それぞれの抗体産生細胞を腹水がん化し、6 抗体をプロテイン G カラムによるアフィニティークロマトグラフィーで純化した。

3. サンドイッチ ELISA による組み合わせの検討

イムノクロマトグラフィーを構築するためには、サンドイッチ ELISA 同様に抗原認識部位（エピトープ）の異なる 2 つの抗体が必要となる。そこで、III.2.で純化した 6

抗体を用いてサンドイッチ ELISA が成立する抗体の組み合わせをスクリーニングした。IgA は 2 本の重鎖からなり、唾液中では 2 量体なので、ほとんどの組み合わせでサンドイッチが成立したが、バックグラウンドが低いこと、抗原濃度依存性が高いことから、表 1 に示す二重丸の組み合わせが適当であることが判明した。固相化抗体と標識抗体を逆にすると反応しにくくなる場合があるのは、抗体により固相化・ビオチン化の影響で失活する場合があるためである。

4. 唾液中の IgA 評価のためのイムノクロマトグラフィーの検出感度設定

イムノクロマトグラフィーを構築する場合、条件によって感度（肉眼による陰性・陽性の判断の限界）が異なる。また、判定が陰陽の二者択一であるため、感度が良すぎても悪すぎても用をなさない。したがって、あらかじめ目標となる感度を決めておく必要がある。図 3 は 20 歳前後の健康な女性 21 名から採取した唾液中の総 IgA をサンドイッチ ELISA で測定した結果であり、12 番は 17 $\mu\text{g/mL}$ と特別低値を示した。この結果はサンプリングを繰り返しても再現性があり、これまでの当研究室における測定を通算すると、約 500 人中最も低値であった。

なお、血液検査における血清 IgA の基準値は 110~410mg/dL で、この範囲に健常人の 95%が入り、10mg/dL 以下の場合に IgA 欠損症と判定される^{12,13)}。12 番の血清 IgA を委託測定したところ 81mg/dL であり、12 番は欠損症ではないが不完全 IgA 欠損症（partial IgA deficiency）ではないかと思われる。IgA 欠損症は無症候である場合が多いため欠損に気付いていないケースも多く、12 番も現在は健康であるが、環境の変化や妊娠、加齢などの影響で後発的に免疫関連の疾患を発症することも考えられる。よって、自分自身に免疫異常がある可能性を事前に知っておくことが重要であると言える。

そこで本研究ではイムノクロマトグラフィー構築の第一段階として、唾液原液で不完全 IgA 欠損症と正常とを区別できる 20 $\mu\text{g/mL}$ 程度を目標感度に設定することにした。

5. イムノクロマトグラフィーの構築

通常のイムノクロマトグラフィーでは何も器具を使わないようにするため、金コロイド標識抗体をしみ込ませたコンジュゲートパッドに試料を滴下しラテラルフロー（水平方向への展開）させる方法が採用されている。本研究では試料中の抗原と金コロイド標識抗体の一次反応の条件検討を容易にするため、96 穴プレートで一次反応を行った後に、固相化抗体を塗布してあるメンブレンをウェルに差し込んで垂直に展開させるテストストリップ法を用いることにした（図 4）。

開発に当たっては、平成25年7月24日（水）に京都高度技術研究所（講義），京都バイオ計測センター（実習）で行われた京都バイオ計測センター人材育成セミナー「イムノアッセイ講座（2）：イムノクロマト開発編」に参加し，そこで使われたニッポンエンジニアリング（株）のテキスト（非売品）を参考にした。

① 金コロイド標識抗体の作製

抗体に金コロイドを標識する工程は，イムノクロマト法の構築に際してもっとも鍵となるステップであり，金コロイド標識抗体を適切な条件で調製しなければ凝集を起こし，正しい結果が得られなくなる。この条件は主に粒子径・pH・抗体濃度の組み合わせで決定されるが，抗体ごとに条件が異なるためそれぞれで検討する必要がある。適切な条件で金コロイドを抗体に標識できた時，500～600nm の吸光度を測ると 520nm に吸収極大ができる。反対に凝集してしまった時，吸光度はなだらかなカーブを描き，溶液は青みがかかる。520/580=1.5～2.0 が適切な値であり，この値を下回ると凝集している確率が高い。

種々検討の結果，下記の条件が適当であることが判明し（520/580=1.5），抗体の保有量と表 1 の結果から抗体④を用いた金コロイド標識抗体溶液を採用した。

- ・金コロイドの粒子径：もっとも一般的な 40nm
- ・抗体の種類と pH：抗体④は pH6.5，⑤は pH6.0
- ・抗体濃度：200μg/mL

②テストストリップの作製

メンブレン（60mm×30cm）への固相化抗体の塗布は，細かい条件検討用にはマイクロピペットを用いて手製で行ったが，最終的には森永生科学研究所に委託してイムノクロマトディスペンサーを用いて行った。

・テストライン：メンブレンの下端から 12mm に，固相化抗体を塗布した。この部分に金コロイド標識抗体と抗原の免疫複合体が展開されてくると，抗原が固相化抗体に結合してサンドイッチが成立するため，金コロイドのバンドが生じる。金コロイド標識抗体として④が適当であったため，表 1 の結果から，固相化抗体は抗体⑥ 1mg/mL を用いることとした。

・コントロールライン：メンブレンのテストラインの 5mm 上端側に，市販の抗マウス IgG を塗布した。

・吸収パッド：展開効率を上げるためメンブレンの上部に市販の吸収パッドを貼付けた。

完成したメンブレンの左右両端を切り落とし，5mm 巾の短冊（約 7cm）を切り出し，抗体がきれいに塗布できているものをテストストリップとして使用した。

③試料（唾液）の希釈

抗原（IgA）が過剰になると，一次反応で余った抗原が固相化抗体と金コロイド標識抗体の免疫複合体との結合時に競合して阻害する「プロゾーン現象」が起こる。上記系で検討した結果，唾液を 0.1%BSA 添加 T-TBS で 40 倍希釈すると適当であった。

6.結果

上述のように構築したイムノクロマトグラフィーに，図 3 の被験者のうち高値を示した 19 番，中央値であった 1 番，低値を示した 2 番および 12 番の唾液を供したところ，前 3 者ではバンドが出現（発色）し 12 番ではバンドが出現しないことが確認できた（図 5）。また，ELISA 法の結果をよく反映し，唾液原液で 50～400μg/mL の IgA 濃

度依存的なテストラインの発色が確認できた。唾液が 40 倍希釈されていることを考慮すれば、本イムノクロマトグラフィーにおける sIgA の検出限界は 1 μ g/mL くらいと思われた。ELISA 法では測定に半日は必要であるが、本法ではわずか 10 分で判定が可能である。このように、唾液中の IgA の簡易スクリーニング法として十分利用できるイムノクロマト試薬の開発に成功した。

今後に向けて

本法により唾液中の総 IgA の簡易検査が可能となったが、さらに今後に向けて下記のような改良が期待される。

1. 高感度化

最近ではアレルギー治療法として寛容誘導が行われるようになってきた。しかし、寛容の成立の確認を患者へのアレルギー投与で試すしかないことが大きな課題となっており、新たなバイオマーカーとして唾液中の抗原特異的IgAが注目されている¹⁴⁾。我々はIgA-ICの測定を提唱しているが、イムノクロマトグラフィーを用いて測定するためにはさらに高感度化が必要である。また、近年デンシトメトリーを用いた定量的イムノクロマトグラフィーも開発されつつあり、導入が望まれる¹⁰⁾。

2. 競合法

今回検討したサンドイッチ法は、検体中の抗原が多いほど強く反応する方法だが、逆に、検体中の抗原が少ないほど強く反応する競合法がある。サンドイッチ法は、検体中の抗原と金コロイド標識抗体の複合体が固相化抗体に結合することで発色するが、競合法では、検体中の抗原と反応しなかった金コロイド標識抗体が固相抗原と結合することで発色する。競合法を用いるメリットは、サンドイッチ法では検体（唾液）の希釈が必要であるが、競合法ではその必要がないという点である。また、大量の反応したものの中から反応していない数本を探すよりも、数本が反応する方がスクリーニ

ングとしても適している。

現在，本学食物栄養学科では食品学実験において簡便な遺伝子診断法として，アルパッチテスト，PTC 味覚異常テストが，バイオサイエンス実験では食物アレルギーの特定原材料検出イムノクロマトグラフィーが取り入れられている。今後本法を学生実験に取り入れて唾液中の IgA スクリーニングをすることにより，IgA（不完全）欠損を未然に発見し，将来生じるかもしれない様々な障害の予防に貢献できるかもしれない。

引用文献

- 1) Mestecky J *et al.*: “Mucosal Immunology”, 4th ed., Elsevier/Academic Press, p429-54 (2015)
- 2) 清野宏編：「臨床粘膜免疫学」，株式会社シナジー， p240-55 (2010)
- 3) Mestecky J *et al.*: “Mucosal Immunology”, 4th ed., Elsevier/Academic Press, p287-324 (2015)
- 4) Kerr MA: *Biochem, J.* , **271**, 285-96 (1990)
- 5) Royle L, *et al.*: *J. Biol. Chem.* **278**, 20140-53 (2003)
- 6) Hirose J, *et al.*: *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 1438-40 (2001)
- 7) 木津久美子，廣瀬潤子，本庄勉，成田宏史：日本栄養・食糧学会誌， **65**, 13-9 (2010)
- 8) Kumiko Kizu, *et al.*: *Food and Nutrition Sciences.* **6**, 221-33 (2015)
- 9) 木津久美子，廣瀬潤子，山口（村上）友貴絵，木村彰宏，成田宏史：京都女子大学食物学会誌， **64**, 5-12 (2009)
- 10) 生物化学的測定研究会編（編集委員：小林典裕，上田宏，三宅司郎，荒川秀俊）：「免疫測定法 基礎から先端まで」講談社， p167-75 (2014)
- 11) Hirose J, *et al.*: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **68**, 2490-97 (2004)
- 12) Brandtzaeg P: “Mucosal Immunology”, 4th ed., Elsevier/Academic Press, p623-81 (2015)
- 13) 金子英雄，鈴木啓子，近藤直実：日本臨床免疫学会会誌， **32**(3), 142-8 (2009)
- 14) Kulis MJ, *et al.*: *Allergy Clin Immunol.*, **129**(4) 1159-62 (2012)

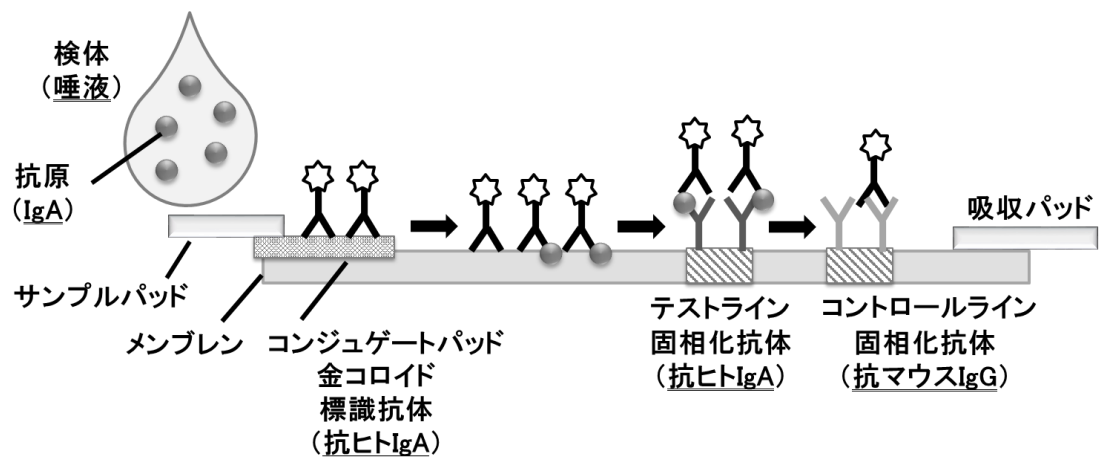


図 1. イムノクロマトグラフィーの概略

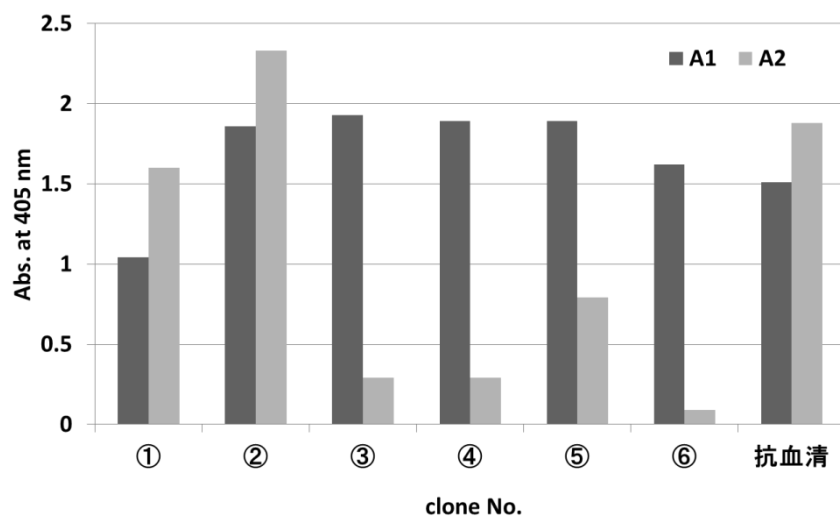


図 2. モノクローナル抗体の反応性

ヒト IgA1, IgA2 を固相化した ELISA プレートにモノクローナル抗体①～⑥の培養上清あるいは免疫マウスから採取した抗血清を加えて反応させた後、アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG で発色させた。

表 1. サンドイッチ ELISA の組み合わせ

固相化抗体とビオチン標識抗体のサンドイッチ複合体をストレプトアビジン化アルカリホスファターゼで発色させてサンドイッチ ELISA の組み合わせを検討した。△，○，◎の順に良好な結果が得られたことを表す。

		標識抗体					
		①	②	③	④	⑤	⑥
固相化 抗体	①		◎	△	△	△	△
	②	◎		◎	○	△	○
	③	○	○		△	△	△
	④	◎	○	△		△	○
	⑤	△	△	△	△		△
	⑥	△	△	○	◎	○	

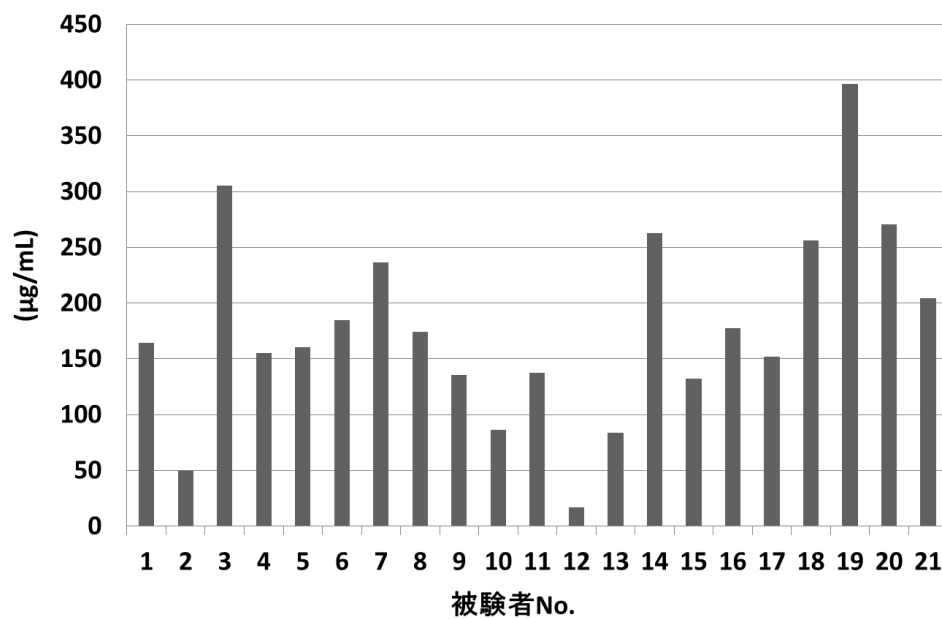


図 3. ELISA による唾液中の IgA の定量

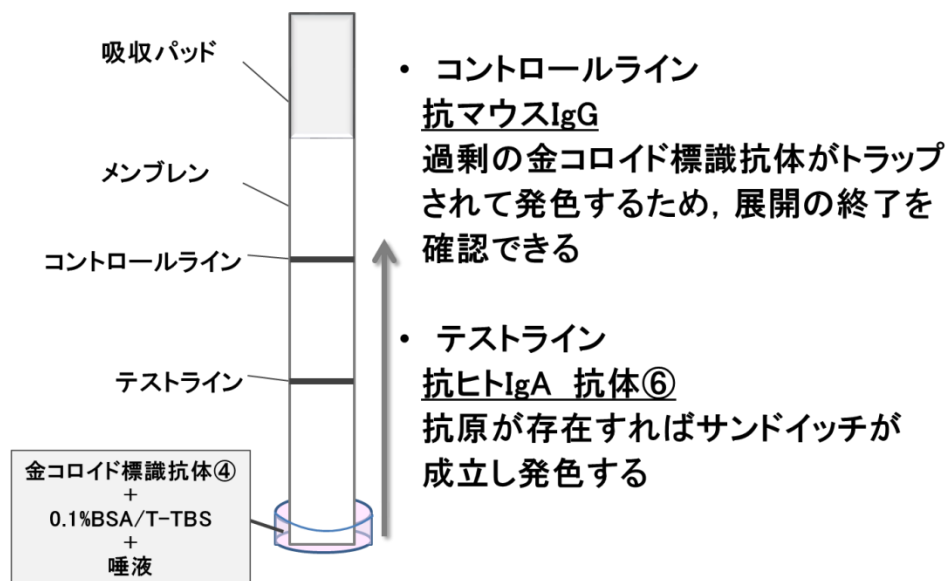


図 4. テストストリップ法の概略

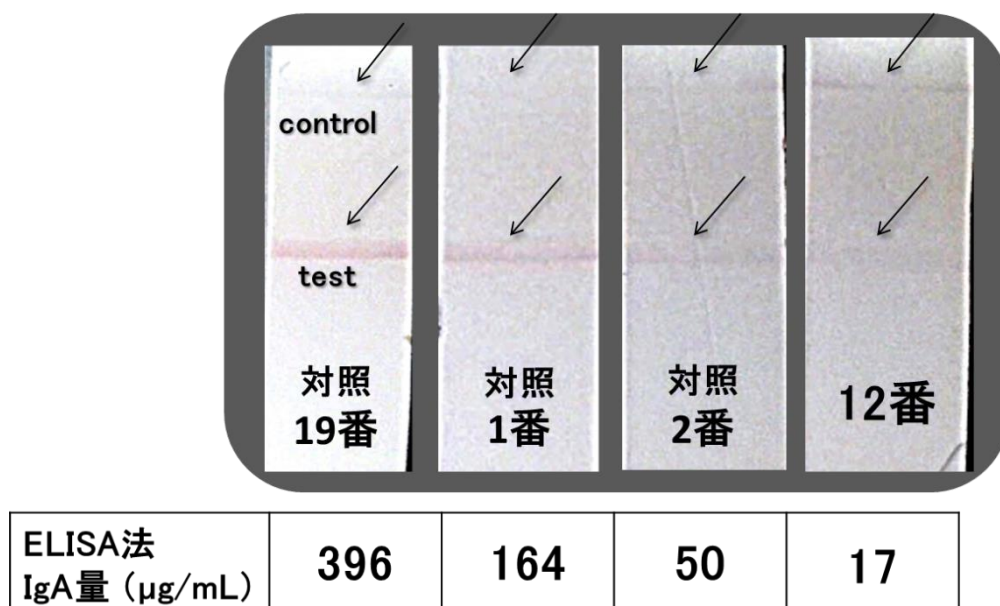


図 5. イムノクロマトグラフィーによる唾液中の IgA の検出

ELISA で高, 中, 低値を示した被験者 19, 4, 2 番ならびに不完全欠損と思われる 12 番の唾液を 40 倍希釈後, イムノクロマトグラフィーに供した。

論文要旨

母乳や唾液などの外分泌液に含まれる二量体の分泌型 IgA (sIgA) は、乳児に感染症に対する受動免疫を与えたり、粘膜で効率よく抗原を排除することで異物の侵入から自身を守ったりする重要な働きを担う。また、抗原と特異的 IgA の免疫複合体 (IgA Immune complex : IgA-IC) は、パイエル板 M 細胞に発現される IgA 特異的な受容体を介して抗原のキャリアとして働き、その結果 IgA 産生を亢進させること、分泌型 IgA に抗原が結合すると細胞の IgA 受容体への結合性が高まることが報告されている。

我々はこれまでに外分泌液中に食品タンパク質に対する IgA-IC が存在すること、さらに食物アレルギーモデル実験系において母親が摂取したタンパク質特異的に乳児に経口免疫寛容が誘導されアレルギー症状が抑制されることを明らかにした。また、仮性 IgA-IC を用い、IgA-IC が免疫寛容誘導因子として機能することを示してきた。

そこで私は、母乳や唾液などの外分泌液に含まれる IgA-IC が「アレルギー予防の飲むワクチン」として機能することをさらに明確にすることで母乳哺育の新たな機能を提唱し、妊娠中・授乳中の母親が偏りのない食生活を送ることの意義の普及に貢献するとともに、新しい食物アレルギー予防および治療法を確立したいと考えた。さらに、母乳だけでなく唾液中の IgA-IC の生理機能解明も目指した。

第 1 章 アレルギー感作母マウスによる母乳を介した経口免疫寛容の誘導

雌マウスをカゼイン餌で飼育し、オボアルブミン (OVA) と Alum で腹腔免疫してアレルギー感作させた後交配し、授乳期間中のみ卵白餌を与えた母親を Allergy Egg (AE) 母とした。OVA で感作せずに交配し、授乳期間中のみ卵白餌を与えた母親を Egg (E) 母、授乳中もカゼイン餌を与え続けた母親を Milk (M) 母とした。各々の母親に母乳哺育された仔を離乳後 OVA と Alum で腹腔免疫し、OVA の経口投与によるアレルギー性下痢誘発試験を行ったところ、AE・E 仔では M 仔に比べて下痢が抑制された。更に、血清中 OVA 特異的 IgE、脾臓細胞培養液中 IL-4 も有意に低かった。また、AE 母乳中に IgA および IgG1 と OVA との免疫複合体が有意に増加していた。以上の結果より、母親がアレルギー感作を受けていても、母親の摂取タンパク質特異的に母乳を介した免疫寛容が仔に誘導される事、その過程に母乳中の OVA 免疫複合体が関与している可能性が判明した。

第 2 章 唾液中の食品タンパク質 IgA 免疫複合体

外分泌液における IgA-IC の存在の普遍性を確認することを目的として唾液解析を行った結果、IgA-IC を構成する食品タンパク質は食事残渣のコンタミではなく、唾液中に分泌されているものであることが明らかになった。

さらに IgA-IC が経口免疫寛容の誘導因子であることを立証する為に、唾液から得た OVA・IgA-IC を直接マウスに投与後、OVA を免疫して血清中 OVA 特異的 IgG1 を評価したところ、対照群に比べて産生が抑制されていた。またその応用として、マウスモノクローナル IgA (mIgA) にスギ花粉抗原の Cry j1 を化学結合させた仮性 IgA-IC を作製してマウスに投与した結果、対照群と比べて仮性 IgA-IC 投与群で Cry j1 特異的 IgG1 と Cry j1 依存 IL-4 の産生が低下していた。以上の結果より、IgA-IC がアレルギー治療のワクチンとして利用できる可能性が示された。

第3章 不完全 IgA 欠損症の発見

女子大生の唾液中の IgA-IC を個別解析した中で、総 IgA 濃度が特別低値を示す被験者を見出し、この被験者が IgA 欠損症である可能性が考えられた。そこで本被験者の血中 IgA を測定した結果、IgA 欠損症ではなかったものの、健常人の 95%が該当する基準値は下回っており、本被験者は不完全 IgA 欠損症ではないかと思われた。さらに父親と父方の祖母において同様に血中 IgA の低値傾向が見られ、遺伝要因の関与が疑われた。そこで、IgA のクラススイッチに関与する遺伝子を中心に遺伝子解析を委託した結果、本被験者と父親に共通する変異は見られなかった。現在さらに全ゲノム解析により本被験者と父親、父方の祖母に共通するミスセンス変異の検索を行っている。

本研究より、血液検査ではなく、無痛無侵襲で誰でも採取できる唾液中 IgA 測定によって IgA 欠損症のスクリーニングや検査ができる可能性が示唆された。

第4章 ヒト IgA に対するイムノクロマトグラフィーの開発

唾液中 IgA の簡易検査法としてイムノクロマトグラフィーの開発を目指した。まず、抗ヒト IgA mAb 6 種を作製し、その中で固相化抗体および金コロイド標識抗体に適したものをそれぞれ検討した。目標検出感度は、これまで本研究室で唾液中 IgA を測定した中で最低値であった唾液 (17mg/mL ; 3 章の不完全 IgA 欠損症の被験者の唾液) を目安にした。その結果、サンドイッチ ELISA での唾液中 IgA 測定の結果を反映する濃度依存的なバンドが検出でき、かつ感度の目安に用いた唾液ではバンドがほとんど目視できない、10 分間で反応が終了するイムノクロマト試薬を作製できた。今後応用として、食物抗原特異的 IgA や IgA-IC のイムノクロマト試薬を開発すれば、経口免疫寛容獲得の評価の為に新たな簡易検査法として利用できるかもしれない。

公 表

第1章 アレルギー感作母マウスによる母乳を介した経口免疫寛容の誘導

- 松永 安由, 木津 久美子, 有田 真緒, 廣瀬 潤子, 成田 宏史
「アレルギー感作母マウスの摂取タンパク質が母乳を介して仔マウスに経口免疫寛容を誘導する」
日本栄養・食糧学会誌
(受付日: 2015 年 9 月 14 日, 受理日: 2015 年 11 月 26 日, 発行: 2016 年 2 月予定) (主著)
- Kumiko Kizu, Ayu Matsunaga, Junko Hirose, Akihiro Kimura, Hiroshi Narita
“Induction of Oral Tolerance in Neonatal Mice by Transfer of Food Allergens as IgA-Immune Complexes in Breast Milk.”
(母乳中食品タンパク質・IgA 免疫複合体の輸送を介した新生児マウスにおける経口免疫寛容の誘導)
Food and Nutrition Sciences 6: 221-233 (2015)

第2章 唾液中の食品タンパク質 IgA 免疫複合体

- Kumiko Kizu, Ayu Matsunaga, Junko Hirose, Akihiro Kimura, Hiroshi Narita
“Induction of Oral Tolerance in Neonatal Mice by Transfer of Food Allergens as IgA-Immune Complexes in Breast Milk.”
(母乳中食品タンパク質・IgA 免疫複合体の輸送を介した新生児マウスにおける経口免疫寛容の誘導)
Food and Nutrition Sciences 6: 221-233 (2015)

第3章 不完全 IgA 欠損症の発見

- 松永 安由, 木津 久美子, 井上 早姫, 浦田 采香, 貫洞 美穂, 成田宏史
「ヒト IgA に対するイムノクロマトグラフィーの開発」
京都女子大学食物学会誌
(受付日: 2015 年 9 月 12 日, 受理日: 2015 年 11 月 6 日, 発行: 2015 年 12 月予定)

第4章 ヒト IgA に対するイムノクロマトグラフィーの開発

- 松永 安由, 木津 久美子, 井上 早姫, 浦田 采香, 貫洞 美穂, 成田宏史
「ヒト IgA に対するイムノクロマトグラフィーの開発」
京都女子大学食物学会誌
(受付日: 2015 年 9 月 12 日, 受理日: 2015 年 11 月 6 日, 発行: 2015 年 12 月予定)

参 考 論 文

なし

以 上

謝 辞

本研究に取り組むにあたり、終始熱心できめ細やかなご指導を賜り、本論文作成の際には懇切丁寧なご助言および熱い激励を頂きました、京都女子大学 成田宏史教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行および本論文作成にあたり、適切なご指導ならびにご助言を賜りました、滋賀県立大学 廣瀬潤子准教，大阪成蹊短期大学 木津久美子講師に深謝申し上げます。

また、本研究における有益なご助言と情報ならびに多くの試料の提供および技術協力をして頂きました、長浜バイオ大学 新蔵礼子教授，小西洋介さん，佐藤優さん，株式会社森永生科学研究所 本庄勉氏，杉田慶氏，地方独立行政法人京都市産業技術研究所 泊直宏氏，いたやどクリニック 木村彰宏氏，長尾助産院 長尾早枝子氏，京都女子大学 宮脇尚志教授に，深く御礼申し上げます。

京都女子大学食物栄養学科の教職員の皆さまには，多くのご指導と励ましの言葉を頂きました。心より感謝いたします。

また，京都女子大学での研究生活において，様々な場面で研究遂行を支えてくださった食品学第一研究室の諸先輩方，協力しともに研究に取り組んでくれた研究室の皆さま，本当にありがとうございました。

最後に，唾液を提供して下さったボランティアの皆さま，特に 3 章で取り上げた被験者の方には，ご本人はもとよりご家族の皆さまも巻き込んで積極的に本研究にご協力いただいたこと，研究を進める中で大きな励みになりました。心よりお礼申し上げます。また，本研究室におけるこれまでの長い研究の過程で，貴重な母乳を提供して下さったお母さま方，大事な母乳を分けてくれた赤ちゃんに深く感謝いたします。母乳哺育により得た恩恵が皆さまの健やかなご成長に繋がっていること，そして今後の皆さまの益々のご健康とご多幸を心より祈念しております。